



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**A ALFARROBA COMO FONTE DE INGREDIENTES
BIOACTIVOS: FIBRA ALIMENTAR, POLIFENÓIS E CICLITÓIS**

Trabalho submetido por
Leila Patrícia Sequeira Alvarez
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2013



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A ALFARROBA COMO FONTE DE INGREDIENTES BIOACTIVOS: FIBRA ALIMENTAR, POLIFENÓIS E CICLITÓIS

Trabalho submetido por
Leila Patrícia Sequeira Alvarez
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Patrícia da Silva Moura

Outubro de 2013

Dedicatória

À minha família e sobretudo aos meus pais; é a eles que dedico esta tese. Porque são a base da pessoa que sou hoje. Porque são o meu apoio, inspiração e força para fazer mais e melhor, não só ao longo do meu percurso académico, como da minha vida. Porque foram eles que acalmaram os meus nervos, as noites mal dormidas e as dúvidas constantes na minha capacidade para fazer tal trabalho. Porque são eles que me limpam as lágrimas e sorriem comigo. E principalmente, porque me amam incondicionalmente. E eu a eles.

Agradecimentos

Neste espaço dedicado ao agradecimento e reconhecimento, quero agradecer de forma particular a todos aqueles que durante este período de trabalho, de forma mais ou menos activa, me ajudaram, apoiaram e estiveram presentes, contribuindo tanto para o meu desenvolvimento pessoal como académico. Acredito que sem vós, este processo não teria sido tão enriquecedor e gratificante. Por isso, muito Obrigada.

Agradeço em particular à Professora Doutora Patrícia da Silva Moura, orientadora da dissertação, pelo apoio, partilha e valiosas contribuições estruturais e científicas.

Agradeço também ao meu amigo Fábio Correia todas as horas incansáveis que dispensou a esta tese, ajudando-me a esclarecer as minhas dúvidas e incentivando-me sempre a prosseguir com o meu trabalho e a acreditar nele.

E um especial e enorme agradecimento aos meus pais pelo apoio incondicional hoje e sempre, pela força, carinho e dedicação que sempre me prestaram em todas as fases deste meu percurso académico.

A todos vocês, um sincero Obrigada.

Resumo

A alfarrobeira é uma árvore de fruto essencialmente presente na zona da bacia do Mediterrâneo e há séculos usada para os mais diversos fins. Inicialmente, a árvore era utilizada como uma excelente fonte de madeira para utensílios ou combustível. Por seu turno o fruto, a alfarroba, era utilizado como alimento para consumo humano e animal devido à sua disponibilidade e fácil adaptação da árvore a habitats menos ricos.

Ao longo do tempo o interesse pela alfarroba foi aumentando e as suas utilizações foram-se diversificando. Actualmente é sobretudo usada para a extracção da goma de alfarroba, comumente denominada *locust bean gum* ou *carob bean gum*. Devido à grande quantidade de taninos presente na constituição da alfarroba, responsáveis por um efeito de adstringência, o fruto é cada vez mais utilizado para outros fins além da alimentação.

Com a evolução tecnológica e a quantidade de estudos que cada vez mais são realizados com enfoque na alfarroba, o conhecimento das suas características e propriedades tem aumentado consideravelmente e, conseqüentemente, as suas utilizações são cada vez mais diversificadas e sofisticadas. O conteúdo da alfarroba em galactomananas e polifenóis faz com que desempenhe um papel cada vez mais importante na indústria biofarmacêutica, uma vez que estes componentes lhe conferem capacidades que permitem a sua utilização na formulação de sistemas de administração de fármacos, no controle do colesterol ou em produtos alimentares para crianças, em particular na formulação de alimentos lácteos espessados para crianças com problemas de refluxo gastroesofágico.

Futuramente o maior potencial da alfarroba poderá estar na luta contra o cancro e contra doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, devido às suas capacidades antioxidantes, anticarcinogénicas e antimutagénicas. Também relacionado com estas capacidades estará a sua utilização em produtos radioprotectores, antimicrobianos e ainda a possibilidade de actuar como um agente benéfico na luta contra doenças cardíacas.

Palavras-chave: Alfarroba, galactomananas, polifenóis, aplicações

Abstract

The carob-tree is a tree dispersed mainly in the Mediterranean basin. For several centuries it has been used for different purposes. Initially, the tree was used as a source of wood for utensils or fuel. The fruit, the carob pod, was used as food for human and animal consumption due to its availability and easy adaptation to poorer habitats.

Over time the interest on carob pod increased, thus diversifying its uses. Nowadays it is used mainly for the extraction of carob gum, most commonly known as locust bean gum or carob bean gum. Due to the amount of tannins in its constitution, which confer a great effect of astringency to the fruit, the use of carob is increasing for alternative applications rather than in the food industry.

With the technological evolution and the increasing amount of studies conducted focusing on carob, the knowledge of its characteristics and properties has increased considerably and its uses are increasingly diverse and sophisticated. Carob pod's content in galactomanans and polyphenols gives it an increasingly important role in the biopharmaceutical industry, since these components can be exploited for the formulation of drug delivery systems, control of cholesterol, or food for children, in particular for the formulation of lactic thickeners for children with gastroesophageal reflux.

In the future, the major potential of carob may be in the fight against cancer and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, due to its antioxidant, anticarcinogenic and antimutagenic capabilities. Also associated with these capabilities are the uses in radioprotective products, antimicrobials and the possibility to act as a beneficial agent in respect to heart diseases.

Keywords: Carob, galactomanans, polyphenols, applications

Índice

1.	Introdução.....	9
1.1.	História	9
1.2.	Descrição botânica da espécie e da família da alfarroba.....	9
1.2.1.	Descrição botânica da espécie	9
1.2.2.	Taxonomia.....	11
1.2.3.	Descrição botânica da família.....	12
1.3.	Distribuição geográfica.....	13
1.3.1.	Habitat.....	13
1.3.2.	Propagação da planta	15
1.4.	Etnobotânica.....	16
2.	Alfarroba.....	18
2.1.	Utilização dos constituintes da alfarroba	18
2.1.1.	Sementes de alfarroba	18
2.1.2.	Polpa da alfarroba	19
2.2.	Galactomananas.....	21
2.2.1.	Introdução.....	21
2.2.2.	Constituição das galactomananas	22
2.2.3.	Extracção e purificação de galactomanana.....	24
2.2.4.	Interesse biofarmacêutico das galactomananas	26
2.2.5.	Mecanismo farmacológico	27
2.2.6.	Aplicações das galactomananas.....	27
2.2.7.	Efeitos da utilização das galactomananas.....	31
2.2.8.	Contra-indicações	32
2.2.9.	Toxicidade.....	33
2.3.	Compostos fenólicos.....	34
2.3.1.	Introdução.....	34
2.3.2.	Constituição dos polifenóis	35
2.3.3.	Extracção e purificação dos polifenóis.....	36
2.3.4.	Biodisponibilidade dos polifenóis.....	39
2.3.5.	Actividade farmacológica dos polifenóis	40
2.3.6.	Mecanismo farmacológico	42
2.3.7.	Aplicações dos polifenóis.....	45

2.3.8.	Efeitos da utilização dos polifenóis	50
2.3.9.	Contra-indicações	51
2.3.10.	Toxicidade	52
3.	Conclusão	55
4.	Bibliografia.....	56

Índice de figuras

Figura 1 – Alfarrobeira (Batlle & Tous, 1997).....	10
Figura 2 – Alfarroba (Macedo, 2006).....	11
Figura 3 – Alfarroba: Fruto (A); sementes (B); germinação <i>in vitro</i> da semente (C); planta aclimatizada em pote de plástico (D). (Adaptado de: Hakim, Islam, Mamun, Ahmed & Khan, 2010).....	13
Figura 4 - Distribuição mundial da alfarrobeira (Batlle & Tous, 1997)	15
Figura 5 - Secções da alfarroba - Semente (C) (Batlle & Tous, 1997).....	19
Figura 6 - Estrutura da galactomanana (Dionísio & Grenha, 2012).....	23
Figura 7 - Processamento da alfarroba (El Batal & Hasib, 2013)	25
Figura 8 - Estrutura de vários polifenóis (Scalbert & Williamson, 2000)	36
Figura 9 - Processo de extracção dos polifenóis (Adaptado de: Avallone <i>et al.</i> , 1997). 38	
Figura 10 - Possíveis vias para os polifenóis consumidos no organismo humano (Scalbert & Williamson, 2000).....	40
Figura 11- Efeito do extracto aquoso das vagens e folhas de alfarroba na apoptose no carcinoma hepático das células da linha T1 em ratos. Tratamento com extracto de folhas (b) ou tratamento com extracto de vagens (c), que causa a fragmentação do ADN em muitas células, como demonstrado nos núcleos escurecidos, indicados nas setas, indicando um aumento nos processos de apoptose., ao contrário das células não tratadas (a), sem escurecimento (Corsi <i>et al.</i> , 2002).....	43

Lista de abreviaturas

CBG – *carob bean gum*

LBG - *locust bean gum*

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

MTT - azul tiazolil tetrazolium bromide

LC-ESI - liquid-chromatography electrospray-ionisation mass spectrometry

ESI-MS - nano-electrospray-ionisation mass spectrometry

GC-MS - gas-chromatography mass spectrometry

TPA - tetradecanoilforbol acetato

DMBA - Dimetibenz(a)antraceno

DHB - ácido dihidroxibenzoico

DHPE - ácido dihidroxifeniletanoico

DHPP - ácido hidrocafeico

DPPE - ácido trans-cafeico

THB - ácido gálico

THPE - ácido etanóico

THPP - ácido propanóico

1. Introdução

1.1. História

A alfarroba tem sido cultivada na maioria dos países da bacia do Mediterrâneo desde a antiguidade (Avallone, Plessi, Baraldi & Monzani, 1997), usualmente em locais secos ou pouco húmidos com solos pobres. O seu valor foi reconhecido na Grécia antiga, trazida do Médio Oriente de onde é nativa para a Grécia e Itália, e pelos árabes, que a disseminaram ao longo da costa norte africana e a norte em Espanha e Portugal. Mais recentemente foi disseminada para outras regiões semelhantes ao Mediterrâneo como a Califórnia, Arizona, México, Chile e Argentina pelos espanhóis, para partes da Austrália por emigrantes oriundos do Mediterrâneo e para a África do Sul e Índia por ingleses (Batlle & Tous, 1997; Dionísio & Grenha, 2012). A produção de alfarroba no mundo é estimada em cerca de 315 mil toneladas por ano e os principais produtores e exportadores são a Espanha (42%), Itália (16%), Portugal (10%), Marrocos (8%), Grécia (7 %), Chipre (6%) e Turquia (5%) (Fletcher, 1997). A área total é de aproximadamente 200 mil hectares e o rendimento depende de práticas de cultivo, da região e da cultura (Makris & Kefalas, 2004).

1.2. Descrição botânica da espécie e da família da alfarroba

1.2.1. Descrição botânica da espécie

A alfarrobeira cresce como um arbusto verde esclerófilo ou como uma árvore que pode chegar aos 10 metros de altura, com uma grande e semiesférica copa e um tronco largo com casca castanha e áspera e ramos robustos. As folhas têm entre 10-20 cm de comprimento, são alternadas, pinadas, com ou sem folheto terminal. Os folhetos terminais têm entre 3 e 7 cm de comprimento, uma forma oval ou elíptica, com 4-10 pares normalmente opostos, coriáceos, verdes escuros e brilhantes por cima, verde pálido por baixo e finamente enervados com margens ligeiramente onduladas com pequenas estípulas. As folhas são esclerófilas e têm uma epiderme superior bastante grossa e apenas com uma camada. As células que contêm os compostos fenólicos nos grandes vacúolos e estoma estão presentes apenas na epiderme inferior e organizados em cachos. A alfarroba não larga folhas no Outono, mas apenas em Julho a cada dois anos e renova as suas folhas parcialmente na Primavera (Abril e Maio) (Batlle & Tous, 1997).

A alfarroba é uma espécie dióica com algumas formas hermafroditas; assim, flores macho, fêmea e hermafrodita nascem, geralmente, em árvores diferentes. Flores unissexuais ou bissexuais são raras na inflorescência. As flores são inicialmente bissexuais, mas normalmente um sexo é suprimido durante o seu desenvolvimento tardio de funcionalidade macho ou fêmea, a dióica não é comum entre as Leguminosae. Em termos evolutivos, unissexualidade é geralmente considerada como um carácter derivado do estado bissexual ancestral (Fletcher, 1997).



Figura 1 – Alfarrobeira (Batlle & Tous, 1997)

As flores são pequenas e numerosas, com 6-12mm de comprimento, organizadas em espiral ao longo do eixo de inflorescência num racemo semelhante a candeias suportado em esporas de madeira velha e até no tronco (caulifloro). As flores são vermelhas esverdeadas, apresentam uma simetria pentâmera com cálice mas sem corola colocada num pequeno pedículo. O cálice tem a forma de disco, é avermelhado e verde e suporta nectários. As flores fêmea consistem num pistilo (6-8,5mm) num disco e estames rudimentares, rodeados por 5 sépalas peludas. O ovário é dobrado, constituído por dois carpelos de 5-7 mm de comprimento e contendo diversos óvulos. O estigma tem dois lobos. As flores macho consistem num nectário com cinco estames com delicados filamentos rodeados por sépalas peludas. No centro do disco existe um pistilo rudimentar. As flores hermafroditas são uma combinação de ambos os tipos, contendo um pistilo e um complemento de cinco estames. Os grãos de pólen libertados dos anteros têm uma forma esférica e são tetracolporados. O pólen tem um diâmetro de 28-29 μm nos pólos e 25-28 μm no equador (Batlle & Tous, 1997).

A fruta é uma vagem indeiscente, alongada, comprimida, recta ou curvada, rija nas suturas, 10-30 cm de comprimento, 1,5-3,5 cm de largura e com cerca de 1cm de espessura com um ápex rombo ou subagudo. As vagens são castanhas com uma superfície enrugada e com textura semelhante a couro quando maduras. A polpa compreende uma camada exterior com textura semelhante a couro (pericarpo) e uma região interna mais macia (mesocarpo). As sementes ocorrem transversalmente na vagem, separadas pelo mesocarpo. São rijas e numerosas, comprimidas numa forma oblonga, oval com 8-10 mm de comprimento, 7-8 mm de largura e 3-5 mm de espessura; a casca é dura e macia, castanho polido e com um hilo mínimo. O número de cromossomas haplóides em *Ceratonia* é $n=12$ e difere de outras *Cassieae* (número base $n=14$), podendo ser aneuplóide (Batlle & Tous, 1997).



Figura 2 – Alfarroba (Macedo, 2006)

1.2.2. Taxonomia

Batlle e Tous (1997), o nome científico da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.) deriva do grego *Keras*, chifre, e do latim *siliqua*, aludindo à dureza e forma da vagem. O nome comum é originário do hebreu *Kharuv*, de onde derivam o árabe *kharrub* e, mais tarde, *algarrobo* ou *garrofero* em espanhol, *carrubo* em italiano, *caroubier* em francês, *Karubenbaum* em alemão, alfarrobeira em português, *charaoupi* em grego, *charnup* em turco e *garrofer* ou *garrover* em catalão. Vários nomes são usados em

diferentes regiões italianas: *ascenedda*, *soscella* (Basilicata); *carrua*, *carrubbi* (Sicília); *carruba*, *sciuscella* (Campania); *carrubbio*, *carrubo*, *cornola*, *corue*, *pselocherato*, *pselocherea* (Puglia); *suscella* (Campania e Puglia); e *garrubaro*, *garrubbo* (Calábria). Na Ásia são usados os seguintes nomes: *chiao-tou-shu* (China), *gelenggang* (Malásia) e *chum het tai* (Tailândia) (Batlle & Tous, 1997).

Taxonomicamente, *Ceratonia* é completamente isolado de todos os outros géneros da sua família. Batlle e Tous (1997) consideram que a alfarrobeira é um remanescente muito isolado de parte da família Leguminosae, hoje extinta em grande parte.

1.2.3. Descrição botânica da família

O género *Ceratonia* pertence à família Leguminosae da ordem Rosales. Os legumes são membros importantes da vegetação tropical, subtropical e temperada espalhadas pelo mundo. Esta é uma das maiores famílias de plantas com flor e inclui 650 géneros e mais de 18.000 espécies (Batlle & Tous, 1997).

A alfarrobeira é geralmente colocada em *Cassieae* da subfamília *Caesalpinioideae*; no entanto, vários autores duvidam da inclusão da *Ceratonia* em *Cassieae*. O número de cromossomas diplóides do género *Ceratonia* é $2n=24$ onde muitos membros do complexo *Cassieae* têm $2n=48$. O género *Ceratonia* é considerado como um dos mais arcaicos dos legumes. Uma segunda espécie de *Ceratonia*, *C. oreothauma*, apenas foi descrita em 1980. Duas subespécies foram distinguidas: *oreothauma*, nativa de Omã, e *somalensis*, nativa do norte da Somália. *Ceratonia oreothauma* é muito distinta morfologicamente da *C. siliqua*. Adicionalmente, *C. oreothauma* tem grãos de pólen ligeiramente mais pequenos que *C. siliqua* e são tricolporados ao invés de tetracolporados (Batlle & Tous, 1997).

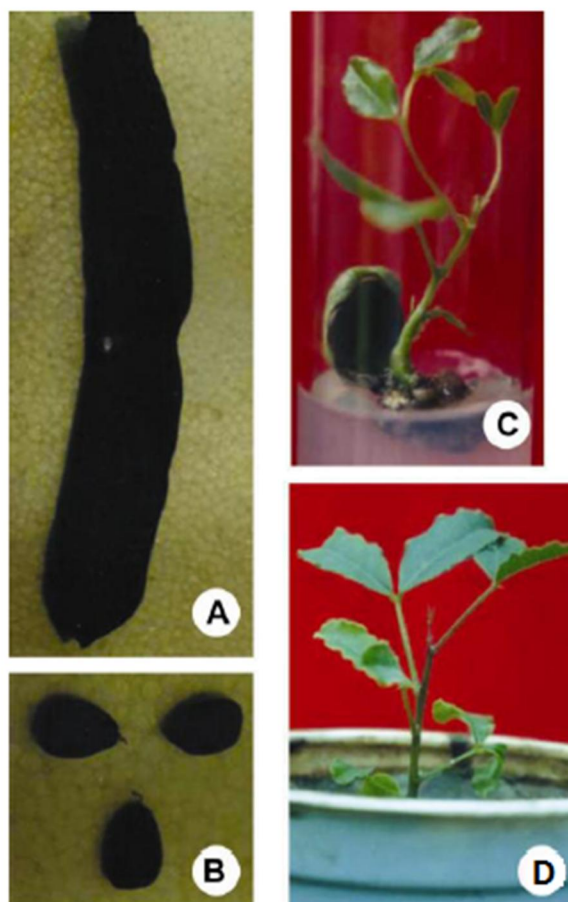


Figura 3 – Alfarroba: Fruto (A); sementes (B); germinação *in vitro* da semente (C); planta aclimatizada em pote de plástico (D). (Adaptado de: Hakim, Islam, Mamun, Ahmed & Khan, 2010)

1.3. Distribuição geográfica

1.3.1. Habitat

A Turquia está localizada na região onde a planta teve origem e tem principalmente duas variedades, cultivada e selvagem. A alfarrobeira é um importante componente da vegetação mediterrânica e o seu cultivo em solos marginais e predominantemente calcários dessa região tem uma grande importância económica e ambiental (Batlle & Tous, 1997).

A árvore é longeva, persistente e termófila que prospera em habitats com climas mediterrânicos. Desenvolve-se em climas temperados e áreas subtropicais e tolera zonas costeiras quentes e húmidas. É uma espécie xerófita bem adaptada às condições ecológicas da região do Mediterrâneo, em virtude da sua eficiente regulação hídrica (Catarino *et al.*, 1981).

As áreas adequadas à alfarrobeira devem ter um clima subtropical mediterrânico com invernos frios mas não gélidos, primaveras temperadas a quentes, e verões quentes a tórridos e secos. Estas zonas devem compreender temperaturas entre 30° a 45° em latitudes mais a norte (bacia do Mediterrâneo, Califórnia e Arizona) e entre 30° e 40° em latitudes mais a sul (Austrália, África do Sul e Chile) (Batlle & Tous, 1997).

As árvores adultas não requerem repouso de Inverno, podem ser danificadas quando as temperaturas caem abaixo dos -4°C e apenas conseguem suportar temperaturas de inverno acima dos -7°C. No entanto, as árvores conseguem suportar temperaturas de verão de 40°C e ventos quentes e secos. São necessárias temperaturas acima dos 9°C durante 5000 a 6000 horas para que as vagens amadureçam. Ventos fortes podem quebrar os ramos das árvores adultas e separar as vagens. O vento pode também causar dano nas árvores jovens. As chuvas do Outono podem interferir com a polinização e afectar a frutificação. A humidade elevada na Primavera promove a infecção por *Oidium* tanto nas folhas como nas vagens (Batlle & Tous, 1997).

As alfarrobeiras podem adaptar-se a uma grande variedade de tipos de solo, desde solos pobres e arenosos e encostas rochosas a solos profundos. Não conseguem suportar alagamentos apesar do sistema radicular ser usualmente profundo. Em áreas com solos rochosos de pouca profundidade o tamanho e produtividade da árvore são reduzidos. Os melhores solos são arenosos e bem drenados, mas solos calcários com elevado conteúdo em limo também são adequados. Sendo uma leguminosa perene resistente a secas (Owen *et al.*, 2003) e requer pouca manutenção (Fletcher, 1997).

A alfarroba também parece tolerar bem a salinidade até 3% de conteúdo em NaCl. Como xerófita, a alfarroba pode sobreviver em climas secos sem irrigação e está bem adaptada a ambientes secos com uma pluviosidade anual entre 250 e 500mm por ano (Batlle & Tous, 1997).



Figura 4 - Distribuição mundial da alfarrobeira (Batlle & Tous, 1997)

1.3.2. Propagação da planta

Os enxertos de alfarroba são criados com sementes polinizadas em aberto, sendo que o resultado varia bastante em termos de vigor, uso e resistência ao frio. É essencial que desenvolvam um bom sistema radicular. As plântulas devem brotar um ano após germinação em viveiro ou dois anos após germinação em pomar, estas plantas são muito sensíveis à geada e assim, em locais gélidos, devem ser protegidas. As sementes usadas para sementeira devem ser completamente abertas e extraídas das vagens da última colheita. A sementeira deve ser realizada na Primavera, entre Março e Abril (Batlle & Tous, 1997).

Antes da sementeira, as sementes leves, vazias ou infestadas devem ser removidas, o que pode ser realizado por imersão em água, em que a maioria das sementes defeituosas flutua na superfície e podem ser facilmente removidas. As sementes de alfarroba permanecem viáveis até 5 anos armazenadas a seco e baixas temperaturas, em recipientes selados (Hong, Linington & Ellis, 1996).

Batlle e Tous (1997) referem que as sementes são viáveis presumivelmente depois de passar através do tracto digestivo de um animal. Sementes de alfarroba

germinam facilmente, mas como a casca é muito rija exigem escarificação com ácido ou tratamento com água quente. A temperatura ideal para a germinação de sementes de alfarroba será de 25°C e 27,5°C, respectivamente. No entanto, nas suas gamas nativas quando estas temperaturas ocorrem (Junho-Setembro), a água não está disponível. Parece provável que alguma germinação ocorra naturalmente em Novembro e as plântulas sobrevivam quando o inverno é ameno.

Segundo estes autores, diferentes misturas de envasamento podem ser usadas, geralmente contêm solo, húmus, perlite e turfa em várias proporções, e costumam ser alteradas com areia para melhorar a drenagem e estrutura. A semente germinada deve ser regada regularmente, mas não alagada, pois pode resultar em *damping-off* e doenças radiculares que causam podridão. As superfícies em que são colocadas as bandejas devem ser limpas e esterilizadas, pois vários agentes patogénicos podem sobreviver nessas superfícies e infectar novos enxertos de plântulas de alfarroba, que devem ser cuidadosamente manuseadas. Referem a alfarroba como sendo difícil de enraizar. O seu potencial de enraizamento adventício é baixo, mas o enraizamento tem sido obtido em estacas de madeira subterminais (2 ou 3 anos de idade). Três aspectos das estacas são importantes para o enraizamento: o tempo de colecta (variação sazonal), tipo de rebento (idade e posição) e genótipo (enraizamento potencial). A micropropagação da alfarroba usando ambos os tecidos jovens e adultos tem sido tentada. No entanto, não há relatos de plantas de cultivo *in vitro* serem estabelecidas com sucesso no campo.

1.4. Etnobotânica

A alfarroba é uma das árvores nativas do Mediterrâneo mais úteis. Em países produtores as vagens de alfarroba têm sido tradicionalmente usadas como alimentação animal e humana e, actualmente, o principal uso é a semente para a extracção de goma. As vagens de alfarroba fornecem forragem para ruminantes. Na natureza, a alfarrobeira fornece abrigo, folhagem e atrai animais que se alimentam da flora superior. As vagens contêm sementes não digeríveis e valiosas. A madeira da alfarrobeira é dura e tem sido usada para fazer utensílios, bem como combustível. A madeira de alfarroba também foi tradicionalmente usada para fazer carvão de combustão lenta. *Ceratonia oreoethauma* é amplamente utilizada para forragem de cabra nas suas gamas nativas (Batlle & Tous, 1997).

Vários produtos são produzidos a partir das sementes e vagens (Fletcher, 1997), com importância económica resultante do uso de goma de alfarroba que é obtido das sementes (Batlle & Tous, 1997).

2. Alfarroba

2.1. Utilização dos constituintes da alfarroba

A alfarroba é amplamente usada como uma árvore ornamental e de sombra nas ruas da Califórnia, Austrália e em outros locais; árvores macho são preferidas para esse efeito pois não provocam lixo pela queda das vagens. No entanto, o valor da alfarroba como tolerante à seca e à poluição atmosférica, de baixa manutenção para rua e ornamental pode ser limitada pelo grande tamanho da árvore madura e pelas fortes e invasivas raízes. A alfarroba tem sido usada em *xerogardening* nos países mediterrânicos, uma vez que requer pouco ou nenhum cultivo, tolera solos pobres e é de longa duração, a alfarrobeira é frequentemente recomendada para o reflorestamento das zonas costeiras degradadas ameaçadas pela erosão do solo e desertificação. Também tem sido recomendada para plantação como quebra-vento em pomares e poderá até ter algum uso para reduzir o ruído das fábricas, estradas e ferrovias através da sua densa folhagem (Batlle & Tous, 1997).

2.1.1. Sementes de alfarroba

As sementes da alfarroba são utilizadas pelo seu conteúdo em goma. O produto da alfarroba mais amplamente utilizado, especialmente para a indústria alimentar, é a goma de alfarroba - *carob bean gum* (CBG) ou *locust bean gum* (LBG). Contudo, a utilização de todo o fruto na alimentação humana é limitada, devido a um elevado nível de taninos causando excesso de adstringência (Avallone *et al.*, 1997).

Esta goma é proveniente do endosperma da semente e quimicamente é um polissacarídeo, uma galactomanana. Cerca de um terço da semente consiste de goma e é obtido a partir do núcleo após a remoção do revestimento e moagem. Cem Kg de sementes produzem uma média de 20 kg de goma seca pura (Batlle & Tous, 1997). A goma de alfarroba é produzida em vários graus de pureza dependendo de quão bem o endosperma é separado do embrião e tegumento. Manchas de cotilédones e casca estão normalmente presentes em preparados de CBG comerciais. Para utilização como aditivo alimentar natural, conhecido como E410 (Urdaín, Doménech-Sánchez, Albertí, Benedi & Rosselló, 2004), apenas um alto grau é admitido, para alimento animal mais resíduos são permitidos (Batlle & Tous, 1997).

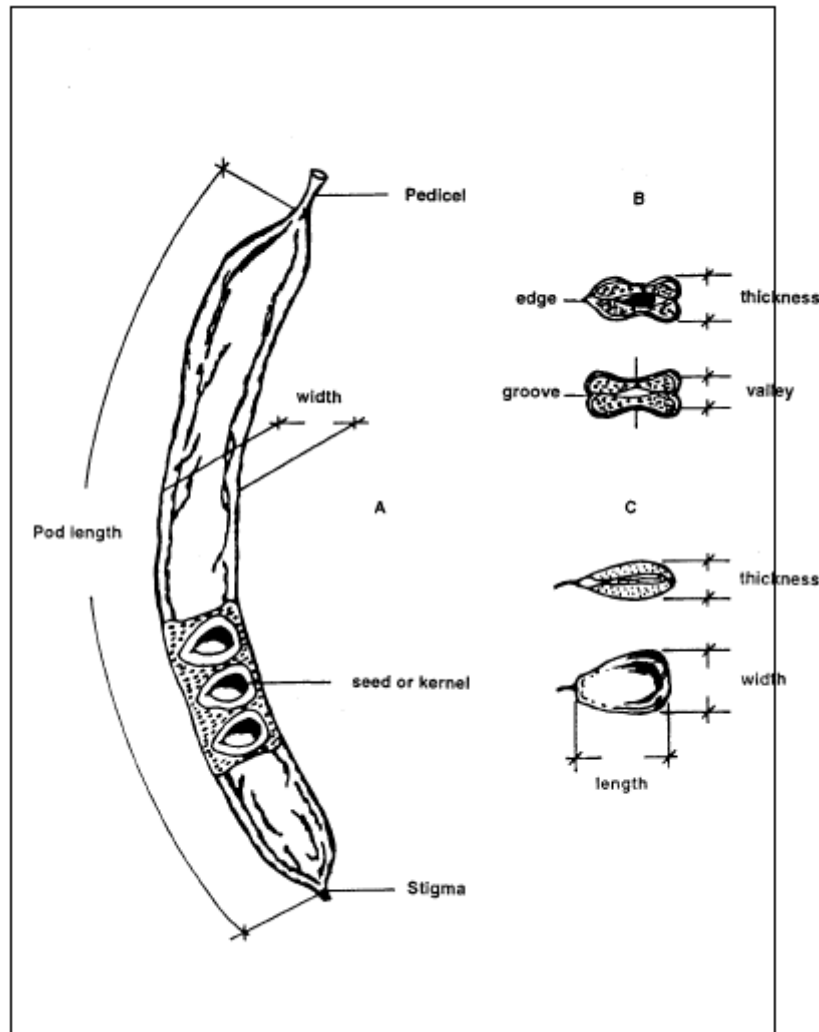


Figura 5 - Secções da alfarroba - Semente (C) (Batlle & Tous, 1997)

Dionísio e Grenha (2012), na sua revisão, referem o crescente interesse na utilização de CBG, enumerando algumas delas, tais como a utilização em agentes estabilizadores e espessantes, tanto na indústria alimentar como cosmética, relevando ainda que a sua utilização já vem de há mais de 50 anos. Na indústria alimentar, como aditivo, é conhecido na União Europeia como E-410. Na indústria farmacêutica tem sido utilizado como excipiente, sobretudo no fabrico de comprimidos, devido a apresentar características como biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo custo.

2.1.2. Polpa da alfarroba

O fruto fresco maduro é composto por cerca de 90% de vagem e 10% de sementes (Fletcher, 1997). A composição em açúcar varia entre 40-60%, predominantemente a sacarose que constitui cerca de 30%. É pobre em proteína (3-4%)

e lipídios (0,4-0,8%) (Ayaz *et al.*, 2007; Santos, Rodrigues & Teixeira, 2005). As vagens também contêm uma grande quantidade de fibras dietéticas e de polifenóis (Owen *et al.*, 2003). A fruta ou os tipos de feijão selvagem contêm proporções relativamente maiores de sementes do que aqueles dos tipos de cultura e da qualidade do grão depende o rendimento de sementes (Batlle & Tous, 1997). As vagens de tipos cultivados são ricas em açúcar e são amplamente utilizadas como matéria-prima para a produção de xaropes (Roseiro, Gírio & Amaral-Collaço, 1991) e, conseqüentemente, as empresas que produzem xarope de alfarroba ou alfarroba em pó, preferem tipos cultivados. A composição química das vagens de alfarroba, por outro lado, varia muito de acordo com a espécie e do clima onde a alfarroba se encontra (Batlle & Tous, 1997; Owen *et al.*, 2003). Os açúcares contidos nas vagens são quase inteiramente de sacarose, frutose e glicose, mas as suas proporções relativas são variável (Sebai *et al.*, 2012).

A polpa pode ser moída num pó fino para utilização em nutrição humana. O pó de alfarroba é composto por 46% de açúcar, 7% de proteína e pequenas quantidades de numerosos minerais e vitaminas sendo, portanto, bastante nutritivo. Após secagem, o pó pode ser adicionado a bolos, pão, doces, gelados ou bebidas como aromatizante. O cacau de pó de alfarroba tem vantagens sobre o chocolate na medida em que tem menos calorias e não tem cafeína nem teobromina. O seu sabor não é tão rico quanto o chocolate escuro mas assemelha-se a leite com chocolate (Batlle & Tous, 1997).

Devido ao alto teor de açúcar da vagem e ao seu custo relativamente baixo, a polpa de alfarroba foi uma das primeiras culturas hortícolas utilizadas para a produção industrial de álcool por fermentação em vários países mediterrânicos, também tem sido muito utilizada como alimento para o gado e em nutrição humana, incluindo doces, biscoitos e bebidas processadas. Em alguns países, como o Egipto, o xarope de alfarroba é uma bebida popular obtida através da extracção de pedaços de alfarroba com água. Organismos unicelulares têm sido usados para converter a polpa de alfarroba num alimento rico em proteínas; soluções de açúcar extraído de vagens de alfarroba são um excelente substrato para a cultura de fungos como *Aspergillus niger* e *Fusarium moniliforme* e o micélio seco é um alimento nutritivo e saboroso que contém até 38% de proteína bruta (Batlle & Tous, 1997).

Batlle e Tous (1997) referem que a massa de alfarroba moída e picada, que são dois dos subprodutos da indústria de melaço de alfarroba, foram testadas no Líbano como substrato para plantas com promissores substitutos para as misturas à base de turfa em viveiros. O possível uso pela indústria alimentar de antioxidantes naturais contidos no revestimento da semente de alfarroba tem levantado algum interesse na indústria de goma de alfarroba.

A goma mucilaginosa, também conhecida como "tragasol", é utilizada numa vasta gama de produtos comerciais como espessantes, estabilizantes, ligantes e gelificantes ou agentes dispersantes. A indústria alimentar usa CBG (*carob bean gum*) para um largo número de mercadorias: sorvetes, sopas, molhos, queijos, tortas de frutas, carnes enlatadas, confeitaria, produtos de panificação e alimentos para animais. As aplicações técnicas da CBG incluem cosméticos, produtos farmacêuticos, emulsões de filmes, tintas, vernizes, cerâmicas e adesivos. Na década de 1980, as aplicações da CBG foram: indústria de alimentos (cerca de 75%) e técnica (cerca de 25%), no entanto, isso mudou na década de 1990 (devido a um aumento do preço da CBG) para cerca de 90 e 10%, respectivamente (Batlle & Tous, 1997).

2.2. Galactomananas

2.2.1. Introdução

Como referido anteriormente, o produto de alfarroba mais amplamente utilizado, especialmente para a indústria alimentar, é a goma de alfarroba (CBG). Esta goma é proveniente do endosperma da semente e quimicamente é um polissacarídeo, uma galactomanana, e é usado como aditivo alimentar natural valioso para produtos como sorvetes, doces e sopas. Também é utilizado nas indústrias têxteis e de cosméticos (Santos *et al.*, 2005).

Dionisio e Grenha (2012) indicam alguns dos termos pelo qual também é conhecido este polissacárido, além da já referida CBG, temos *carob seed gum*, *carob flour* ou ainda *ceratonia*, derivado do nome em latim. Referem ainda que os polissacarídeos têm sido cada vez mais usados no campo da biomedicina, assumindo uma posição cada vez mais marcada. Além da sua diversidade em estruturas químicas e

propriedades físicas permitem ainda um leque bastante variado de aplicações, que vai desde a engenharia de tecidos a mecanismos de entrega de fármacos, entre outros. As suas funções passam por agentes espessantes, gelificantes, emulsionantes, hidratantes ou de suspensão. A unidade base mais comum entre os polissacarídeos é o monossacárido D-glucose, ainda que frequentemente se encontrem D-frutose, D-galactose, a L-galactose, D-manose, L-arabinose e D-xilose, sendo que alguns polissacarídeos são denominados enquanto tal pela unidade de açúcar que contêm. Assim, a goma de alfarroba, sendo um polissacarídeo constituído por unidades de manose e galactose, é uma galactomanana.

A principal propriedade deste polissacárido natural é a alta viscosidade da sua solução em água, numa grande variedade de temperaturas e pH (Batlle & Tous, 1997). Estes dois autores relevam ainda duas outras importantes propriedades da CBG, a sua grande capacidade de se ligar com a água, formando soluções muito viscosas com elevadas diluições (1% ou inferior), assim como o potencial de interacção com outros polissacáridos criando um efeito sinérgico. Referem ainda que o alto valor proteico (50%), que pode ser obtido a partir dos cotilédones, tem interesse para alimentação humana e animal.

2.2.2. Constituição das galactomananas

Batlle e Tous (1997) indicam que os constituintes da semente se distribuem, por peso, em tegumento (30-33%), endosperma (42-46%) e embrião (23-25%), sendo que o tegumento contém antioxidantes. Dionísio e Grenha (2012) indicam que as galactomananas constituem aproximadamente 80% da constituição da semente, sendo o restante correspondente a proteínas e impurezas.

A galactomanana constituinte da semente de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) é um polissacárido composto por unidades de manose e galactose com um rácio de 4:1 muito semelhante à goma de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), com uma proporção de 2:1, e à goma de tara (*Caesalpinia spinosa*), com uma proporção de 3:1 (Batlle & Tous, 1997; Mathur & Mathur, 2005), sendo um carboidrato de reserva presente em grandes quantidades no endosperma das sementes de todas estas leguminosas e que podem ser diferenciadas pelo rácio de manose/galactose, pelo padrão de substituição de unidades

de cadeia lateral e pelo seu peso molecular, factores influenciados pela colheita e práticas de fabrico (Picout, Ross-Murphy, Jumel & Harding, 2002).

Avaliando a estrutura da galactomanana aponta-se como principal característica para a sua solubilidade em água o seu teor superior em galactose, bem como a distribuição aleatória de galactose ao longo da cadeia de manose (Mathur & Mathur, 2005; Picout *et al.*, 2002). Uma das vantagens mais importantes dos recursos vegetais é a capacidade de os produzir e renovar, cultivando e colhendo de forma sustentável, permitindo uma produção constante de matéria-prima. No entanto, também coloca desafios ao nível da produção de pequenas quantidades, a sua estrutura complexa que pode diferir consoante a localização da produção ou a estação em que a colheita é feita, sendo que estes factores podem interferir com as propriedades da matéria-prima (Dionísio & Grenha, 2012).

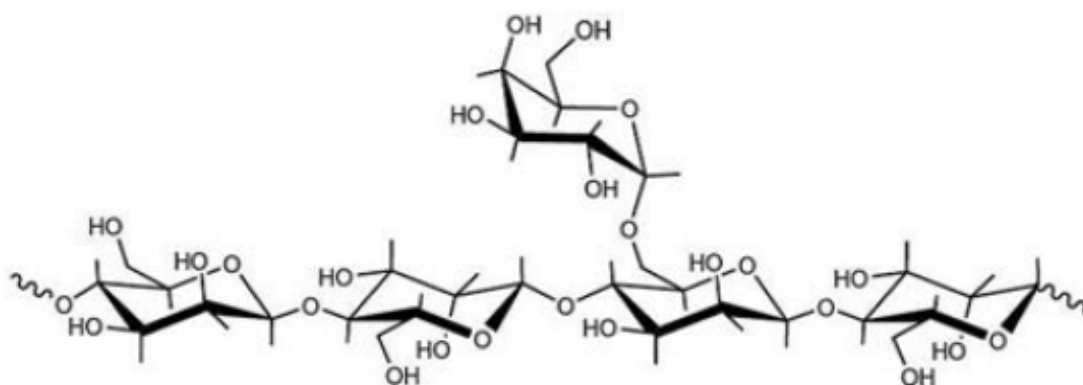


Figura 6 - Estrutura da galactomanana (Dionísio & Grenha, 2012)

A CBG é considerada polidispersa que, neste caso, resulta de três tipos de variação na estrutura que compreendem o grau de substituição de galactose, o padrão de grupos laterais de galactose e a dimensão da cadeia ou grau de polimerização (Dionísio & Grenha, 2012). Além disso, salientam, o grau de substituição da cadeia de manose vai afectar a solubilidade do polímero, sendo esta, possivelmente, umas das principais desvantagens que impede a aplicação mais frequente deste polissacarídeo no campo da biofarmacêutica, uma vez que a solubilidade é uma das principais propriedades a serem controladas e cuja estabilidade deve estar definida dentro de determinadas condições.

2.2.3. Extração e purificação de galactomanana

Dionísio e Grenha (2012) apresentam uma descrição do processo de tratamento dos produtos da alfarroba. As sementes, constituindo aproximadamente 10% do peso do fruto, são processadas industrialmente fragmentando a casca, passando por uma fase de peneira até às operações de moagem para isolar e triturar o endosperma, após o qual são vendidos como farinha crua. O conteúdo em proteínas é aproximadamente de 32% em albumina e globulina, enquanto os restantes 68% correspondem a glutelina (Smith, 2009). Por seu turno, as impurezas podem estar relacionadas com cinza e matéria ácida não-solúvel (Dionísio & Grenha, 2012). Depois do processamento da semente, a galactomanana bruta pode ser submetida a vários processamentos para eliminar o conteúdo em proteína e impurezas.

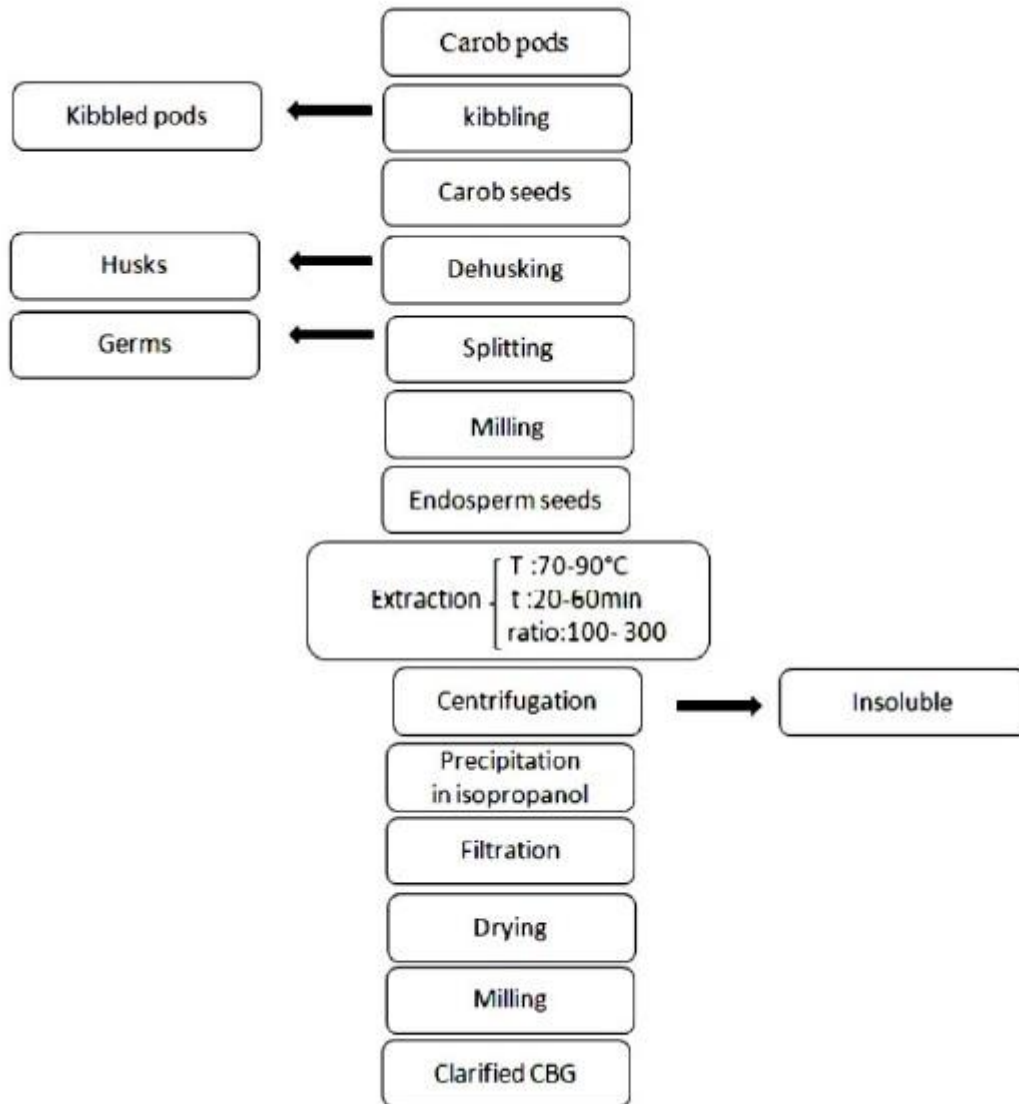


Figura 7 - Processamento da alfarroba (El Batal & Hasib, 2013)

Estes processamentos incluem hidrólise alcalina ou enzimática, precipitação com etanol ou isopropanol e purificação com metanol, cobre ou complexos báricos. As impurezas permanecem geralmente insolúveis, mesmo aquecidas a temperaturas tão altas como 70°C. A precipitação com isopropanol revela-se bastante eficiente na eliminação de proteínas. Quando utilizados estes processos de purificação verifica-se que a razão manose/galactose aumenta e decrescem as proteínas e impurezas (Dionísio & Grenha, 2012).

Já em 1994, Petit e Pinilla haviam concluído que pode ser obtido xarope de açúcar a partir das vagens de alfarroba com um elevado grau de pureza e, embora o tivessem feito em pequena escala, afirmavam, então, que podia perfeitamente ser automatizado e feito em larga escala.

2.2.4. Interesse biofarmacêutico das galactomananas

Dionísio e Grenha, no seu artigo publicado em 2012, referem que o interesse nas galactomananas extraídas da semente de alfarroba tem aumentado significativamente na área biofarmacêutica, particularmente em fármacos administrados por via oral, desenvolvendo sistemas de administração de fármacos, entregando a dose definida, na taxa pretendida e para o alvo biológico almejado. No trabalho de revisão destas autoras são ainda colocados em destaque as propriedades da CBG que a tornam determinante nas aplicações biofarmacêuticas e as sinergias mais eficazes com outros polissacarídeos, sendo que os factores que mais contribuem para este aumento de interesse derivam dos relatos quanto à biodegradabilidade, baixa toxicidade e disponibilidade a baixo custo.

As galactomananas são moléculas hidrófilas, pelo que a sua solubilidade pode ser reduzida, a CBG tem a capacidade de formar soluções muito viscosas a concentrações relativamente baixas, praticamente sem ser afectada pelo pH, sais ou temperatura (Dionísio & Grenha, 2012). Sendo a razão manose/galactose a propriedade que vai afectar a solubilidade, isto é, quanto maior a substituição por galactose maior a solubilidade (visto esta ser mais hidrofílica), a CBG apresentará menor solubilidade quando comparada com outras galactomananas (Picout *et al.*, 2002).

A aplicação na biofarmacêutica de materiais baseados em polímeros deve atender a um aspecto bastante importante que está relacionado com a biodegradabilidade no organismo, esta deve acontecer sem a necessidade de qualquer intervenção extra. Sabe-se que, no caso de polímeros naturais, esta é levada a cabo pela acção de enzimas, microrganismos e pH, através de complexos processos biológicos, físicos ou químicos que quebram as cadeias, alterando as suas propriedades, como por exemplo peso molecular e solubilidade. No caso particular da CBG, sabe-se que esta é naturalmente decomposta no organismo através de acção enzimática, uma vez que várias enzimas levam a cabo a clivagem da sua macromolécula, sobretudo devido à

acção da β -mananase. Esta enzima está presente no organismo humano na região do colón (Dionísio & Grenha, 2012) pelo que muitos dos fármacos cujo alvo é esta região anatómica são desenvolvidos recorrendo à CBG. Além da β -mananase, outras enzimas actuam sobre a CBG para a sua completa degradação, que só é completada após a acção da β -manosidase e da α -galactosidade. Respectivamente, estas três enzimas, são responsáveis pela degradação das ligações β -(1,4)-D das cadeias de manose (convertidas em manobiose, manotriose e galactomanobiose) (Civas, Eberhard, Le Dizet & Petek, 1984), resíduos de manose e galactose (produzindo D-manose e D-galactose). Todas elas foram detectadas em conteúdo fecal (Jain, Gupta & Jain, 2007) reforçando o potencial da CBG na aplicação de fármacos com acção ao nível do colón, bem como o assegurar da sua degradação em qualquer modalidade de administração oral, tal observação é reforçada através de vários relatos de que esta degradação *in vivo* da CBG ocorre também por acção de bactérias no colón (Dionísio & Grenha, 2012), especificamente atribuída a *Bacteroides* e *Ruminococci* (Jain *et al.*, 2007).

2.2.5. Mecanismo farmacológico

Quanto ao mecanismo farmacológico e acções específicas da CBG no organismo, (Zunft *et al.*, 2003) fazem menção ao seu efeito hipolipidémico, baixando o nível de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) como consequência do alto conteúdo em fibra insolúvel. Dionísio e Grenha (2012) fazem também referência ao mesmo, reforçando o reconhecimento da CBG como benéfica para o controlo da hipercolesterolemia e ainda que pode reduzir a síntese hepática de colesterol, ainda que outras galactomananas sejam mais eficientes para o efeito. Outra aplicação farmacológica da CBG prende-se com o tratamento da diabetes (Tsai & Peng, 1981) ou ainda em produtos dietéticos devido à sua capacidade gelificante, formando um gel que não é facilmente assimilado no tracto gastrointestinal, assim como ao ser ingerida provocar uma sensação de saciedade, resultando numa menor absorção de nutrientes (Urdiain *et al.*, 2004).

2.2.6. Aplicações das galactomananas

2.2.6.1. Alimentação

Miyazawa *et al.* publicaram em 2004 um artigo onde apresentam os efeitos da CBG, quando usada em leites anti-regurgitação, sobre a regurgitação em refluxo

gastroesofágico não-complicado. Neste artigo incidem muita da sua abordagem no que à aplicação de diferentes dosagens diz respeito.

A viscosidade de leites anti-regurgitação disponíveis comercialmente com CBG variam entre 320 e 530 mPa.s a pH 5, sendo que a concentração de CBG necessária a providenciar esta viscosidade varia entre 0,4-0,45g por cada 100mL. Ainda assim, a viscosidade óptima para fórmulas para redução de regurgitação e alimentação confortável para crianças ainda não foi suficientemente investigada. Neste estudo foram averiguados tanto o número como o volume de regurgitações, o tempo de ingestão e volume consumido, o ganho de peso e a frequência de movimentos intestinais em crianças a quem foram administradas estas fórmulas espessadas com diferentes concentrações de CBG, que neste tipo de produtos varia entre 0,4 a 0,5 g/ml. No entanto, referem os autores, não foram conduzidos estudos para determinar o seu efeito na regurgitação previamente ao seu trabalho. Assim, compararam dois leites anti-regurgitação com diferentes concentrações de CBG.

À data não existiam relatos de efeitos adversos da CBG e no estudo por si conduzido não notaram sintomas que pudessem estar relacionados com o leite, ainda que tenham antecipado alterações nos movimentos intestinais, uma vez que a CBG não é absorvida no tracto gastrointestinal. Os resultados deste estudo mostraram que os movimentos intestinais foram maiores com fórmulas mais concentradas, ainda que a diferença tenha sido pequena, pelo que, concluíram, que as alterações na frequência de defecação não teriam significado clínico. Concluíram ainda que os resultados deste estudo em crianças sem complicações de regurgitação gastroesofágico não seriam aplicáveis a crianças com severas complicações de regurgitação, cujas complicações incluem dificuldades de crescimento, esofagite ou desordens respiratórias. No entanto, concluíram que indivíduos com problemas de regurgitação a quem é administrado leite anti-regurgitação apenas apresentam regurgitação não-complicada e, assim, um leite com uma menor concentração de espessante trataria maiores benefícios.

2.2.6.2. Formulação e administração de fármacos

Dionísio e Grenha (2012) salientam os esforços que têm sido conduzidos nas últimas décadas relacionados com o desenvolvimento de sistemas eficazes de aplicação de fármacos que evitassem ou minimizassem os efeitos secundários ao mesmo tempo

que melhorassem a eficácia terapêutica. Desta forma, a aplicação de polímeros naturais em biofarmacêutica tem sido ampla e variada indo desde implantes, filmes, micro e nanopartículas, sistemas injectáveis e inaláveis, formulações de gel ou líquidos viscosos, entre outras. Além da forma de dosear, as funções também têm sido muitas, tais como revestir, espessar, aumentar viscosidade, estabilizar, solubilizar, emulsificar, suspender, gelificar, etc. (Beneke, Viljoen & Hamman, 2009). Particularmente, a CBG está relacionada, sobretudo, com a sua capacidade gelificante e as sinergias que permite com outros polissacarídeos. No seu estudo em particular, testaram o efeito da CBG na viabilidade das células Caco-2 com um ensaio envolvendo azul tiazolil tetrazolium bromide (MTT), cujos resultados revelaram uma viabilidade entre 73-81% com concentrações de CBG que variaram entre 0,1-1 mg/ml, considerado pelas autoras como bastante relevantes para a utilização de CBG como veículo de administração de fármacos. Concluem as autoras que estas observações eram esperadas devido ao facto de não serem expectáveis efeitos adversos através de compostos de unidades básicas de açúcar. Referem ainda que, embora a utilização da CBG seja maioritariamente oral e a sua formulação seja quase exclusivamente em comprimidos, existem alguns relatos de uso tópico, ocular, bocal e colónico, com sistemas de hidrogel e multiparticulado.

No que diz respeito à sua utilização em sistemas de aplicação de fármacos por via oral, sendo a mais conveniente e comum, o foco está, sobretudo na produção de comprimidos, sendo a CBG usada para formar a sua matriz (Dionísio & Grenha, 2012) usando a sua capacidade de expansão para que a libertação do fármaco seja mais controlada. Na maioria dos casos observa-se ainda um maior efeito quando é usada em associação com outros polímeros. Malik *et al.* (2011) indicam a habilidade da CBG em actuar como superdesintegrante em comprimidos orodispersíveis, resultado do seu trabalho onde foi feita a incorporação de 10% de CBG em comprimidos de nimesulida, observando-se um tempo de desintegração de 13 segundos, comparando com o dobro do tempo de desintegração quando usado *cross-carmellose* de sódio.

Dionísio e Grenha (2012) referem que a combinação de CBG com outros polissacarídeos é frequente e em muitos casos beneficia de sinergias entre os diferentes materiais, como no exemplo anterior, nestas sinergias o comportamento de libertação do fármaco pode ser regulado pela CBG, caso seja associada a goma xantana ou a goma de karaya, na razão de 1:1. No entanto, esta mistura deve ter uma concentração que seja o

dobro da concentração do fármaco, ou seja, na razão de 1:2 entre fármaco e polímeros (Moin & Shivakumar, 2010). Contudo, Dionísio e Grenha (2012), advertem que existem resultados contraditórios no que à capacidade da CBG, de controlar a libertação de fármacos de forma controlada, diz respeito. Segundo os autores tal deverá estar relacionado com as diferenças entre a CBG usada, considerando diferentes origens ou outros componentes das formulações que poderão afectar o comportamento das mesmas.

Outra aplicação oral da CBG é a preparação da mesma em hidrogéis para a aplicação de prednisolona, em que o aumento da concentração de goma resulta numa diminuição do rácio de libertação do fármaco, fruto da densidade da estrutura tridimensional da rede matriz do hidrogel formado pela goma (Dionísio & Grenha, 2012). Finalmente, Chourasia e Jain (2003), completam o leque de utilizações da CBG, em sistemas de administração de fármacos por via oral, com a formulação multiparticular, nomeadamente, microsferas. Com esta formulação é reportado que a associação com os fármacos aumenta bastante a eficácia.

Outras aplicações de CBG em sistemas de aplicação de fármacos são indicadas no trabalho de Dionísio e Grenha (2012), entre elas a utilização em sistemas de aplicação de fármacos na zona do colón, já referida anteriormente. Nesta zona estão presentes grandes quantidades de polissacarídeos, existe um grande número de bactérias que produzem muitas enzimas (Jain *et al.*, 2007).

Além desta utilização e do tratamento de doenças inflamatórias no cólon é também utilizada neste âmbito em fármacos cuja absorção no tracto gastrointestinal superior é dificultada (Chourasia & Jain, 2003). Apesar da nota de que não houve continuidade com estudos relacionados com sistemas de aplicação de fármacos ao nível ocular com CBG, Dionísio e Grenha (2012) referem uma formulação com CBG encapsulando gentamicina através de emulsificação que, por sua vez, foi mais tarde incorporado num gel de álcool de polivinil para aplicação na superfície ocular em que a CBG teve um papel determinante no ritmo de libertação do fármaco, baixando cerca de 50% com apenas 10% de CBG.

Também está descrita a sua utilização em sistemas de administração de fármacos na mucosa bucal, por exemplo no trabalho de Mujoriya *et al.* (2011) e Şenel

(2010), descrevem esta aplicação como tendo duas grandes vantagens, a prevenção da eliminação pré-sistémica no tracto gastrointestinal e hepático. Desta forma a biodisponibilidade dos fármacos é aumentada, pois no tracto gastrointestinal seriam pobremente absorvidos. Uma vez que sistemas de administração bocais devem ser fortemente aderentes à mucosa, devem ser usados polímeros com boa adesão à mucosa, sendo a CBG um polímero com esse perfil (ainda que, ressalvam os autores, haja outros polímeros com maior capacidade que a CBG).

Finalmente, ao nível de aplicações tópicas existem trabalhos referentes à CBG, como o dos autores Carafa *et al.* (2011). Dionísio e Grenha (2012) sumarizam esta aplicação dizendo que a incorporação de niosomas em hidrogel com uma associação de CBG e goma xantana permite um efeito protector para a integridade dos niosomas e uma libertação lenta do fármaco a partir do sistema de polissacarídeos até 50 horas.

2.2.7. Efeitos da utilização das galactomananas

Em 2000, Khoshoo *et al.* conduziram um estudo relacionado com produtos alimentares com fórmulas baseadas em espessantes para o controlo de refluxo gastroesofágico em crianças. No final do estudo chegaram a diversas conclusões, entre elas a de que o uso deste tipo de produtos pode aumentar a quantidade de alimento efectivamente ingerido. Outras conclusões retiradas deste estudo foram:

- Utilizar este tipo de produtos em crianças que já têm uma ingestão de alimento adequada pode ser um risco, sendo a sobrealimentação um factor de risco;
- Apesar deste tipo de produtos ser, à data, recomendado não existia, até então consistência nos dados publicados sobre a eficácia dos mesmos relativamente ao refluxo gastroesofágico, assim como às consequências ou benefícios nutricionais;
- A utilização de produtos não farmacológicos pode ser importante como alternativa a procinéticos.

Em 2002, Aggett *et al.* emitiram uma opinião médica relacionada com produtos alimentares para crianças baseados em leite usados como agentes antirefluxo e antiregurgitação, isto é, dietas baseadas em leite com espessantes, nomeadamente CBG.

Neste comunicado referem que a monitorização do pH esofágico mostrou que leite espessado com farinha de arroz ou CBG diminuiu o número de episódios de refluxo ácido, embora a duração total de exposição ao ácido permaneça inalterada, presumivelmente devido a uma saída do esófago mais lenta do ácido, mais espessado, do refluxo. Desta forma, uma incidência aumentada de tosse associada a uma dieta com leite espessado foi atribuída à diminuição da saída do ácido do refluxo. Ainda assim referem que há um benefício com leite espessado na dieta de crianças que frequentemente regurgitam, neste caso existe uma diminuição da regurgitação e consequentemente diminuição da perda de nutrientes.

No que diz respeito a adultos, Aggett *et. al* (2002) referem que espessantes alimentares atrasam o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrointestinal, já em crianças a CBG induz frequentemente fezes soltas e gelatinosas. Referem ainda que vários agentes espessantes, incluindo goma de guar, CBG e polissacáridos de rebentos de soja, têm o potencial de diminuir a absorção intestinal de carboidratos, gorduras, cálcio, ferro, zinco e cobre. Adicionalmente alteram a utilização metabólica de substratos dietéticos e alteram as respostas das mucosas e resposta endócrina.

Referem ainda que foram realizados estudos em animais onde o uso de CBG na dieta diminuiu o crescimento, ainda que não exista informação disponível que seja conclusiva no que respeita aos efeitos potenciais dos agentes espessantes na biodisponibilidade de nutrientes dietéticos e no crescimento de crianças.

Além do referido anteriormente existem também relatos de reacções alérgicas em adultos por exposição a CBG no local de trabalho e em crianças alimentadas com leite anti-refluxo espessado com CBG. O comunicado termina com a conclusão do Comité Científico de Alimentação da Comissão Europeia cuja recomendação vai no sentido de não ser necessário aplicar dietas com fórmulas espessadas a crianças saudáveis.

2.2.8. Contra-indicações

Aggett *et al.* (2002) emitem, também, informação relativa a contra-indicações à aplicação destes produtos. Tecem algumas considerações ao que é expectável, estabelecendo uma comparação com o que deve ser evitado. Assim, referem que a

eructação durante e após comer é um processo fisiológico e desejável que liberta o gás engolido durante a ingestão e pode ajudar à diminuição da regurgitação pós-prandial, sendo que, normalmente, as crianças não necessitam de intervenções dietéticas ou terapêuticas. Da mesma forma, regurgitação suave a moderada durante e após alimentação em crianças é um achado comum, geralmente consequência de refluxo gastroesofágico e um fenómeno fisiológico, transiente e fisiológico.

Em sentido oposto a crianças mais velhas e adultos, em crianças jovens um pequeno refluxo pode induzir a que o leite seja expelido devido ao diminuto esófago. À medida que a criança cresce e o esófago alonga e os mecanismos do esfíncter gastroesofágico se desenvolvem a frequência e a quantidade relativa de refluxo diminuem. Na ausência de outros sintomas ou achados patológicos, regurgitação suave a moderada em crianças não requiere procedimentos de diagnóstico, nem intervenções dietéticas ou terapêuticas. Apenas em alguns indivíduos é frequente cuspir ou existir sintomas patológicos de refluxo gastroesofágico em que o esófago pode ter lesões induzidas pelo ácido onde pode desenvolver-se esofagite e causar sintomas como dor, dificuldades em comer, atraso no crescimento ou aspiração pulmonar. Se existir suspeitas de refluxo gastroesofágico patológico são necessários procedimentos de diagnóstico para averiguar a severidade do problema, para detectar desordens secundárias ao refluxo, assim como determinar que medidas terapêuticas a adoptar, incluindo a utilização de fármacos.

Em contraste, a grande quantidade de crianças com regurgitação frequente sem indicação de complicações costumam requerer apenas aconselhamento dos responsáveis pelos cuidados, sem quaisquer medidas de diagnóstico ou de terapia. Nestes indivíduos são frequentes pequenas quantidades de alimento e eructação pós-prandial e estes produtos ajudam a resolver a frequência com que expelem alimento.

2.2.9. Toxicidade

Quanto à toxicidade poderão ser considerados os efeitos descritos por Aggett *et al.* (2002) relacionados com alterações comportamentais das crianças. Os autores referem que as dietas de leite espessadas, em crianças que expelem alimento frequentemente serão, apresentam resultados que podem levar à interpretação de que o

aumento da densidade energética na dieta aumenta a osmolaridade dietética, resultando em sedação e, assim, causar alterações no comportamento das crianças.

2.3. Compostos fenólicos

2.3.1. Introdução

Na Sicília, a vagem de alfarroba tem sido utilizada na alimentação humana há séculos, por exemplo, na preparação de bolos caseiros. Esta utilização popular foi, muitas vezes, restrita a períodos de baixa disponibilidade de alimentos e limitada pelo excesso de adstringência acima indicado. Os taninos são compostos polifenólicos complexos que se encontram presentes numa grande variedade de alimentos e alimento para animais de origem vegetal (Ayaz *et al.*, 2007). Existe uma grande variedade de polifenóis, incluindo ácidos cinâmicos, benzóicos e flavonóides, como as proantocianidinas (Arts & Hollman, 2005).

Os taninos são complexos compostos polifenólicos que estão presentes numa grande variedade de alimentos e produtos alimentares de origem vegetal. Podem ser classificados em dois grupos, taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácido gálico ou ácido elágico (galo e elagitaninos) esterificado a uma molécula nuclear, usualmente glucose ou um polifenol como as catequinas, enquanto os taninos condensados são polímeros de flavonóides. Os taninos são um dos compostos que contribuem para o sabor amargo e para a adstringência característicos da fruta e podem interferir com o processo digestivo ao reagirem com determinadas proteínas ou inactivando enzimas proteolíticas envolvidas no processo digestivo (Avallone *et al.*, 1997).

O passo crítico na análise de taninos é a sua extracção (Scalbert, 1992). Os taninos extraídos foram em seguida caracterizados e expressados em polifenóis totais, proantocianidinas, elagitaninos e galotaninos. Os taninos não extraídos são estimados no resíduo de extracção após a sua transformação em antocianidinas obtidas por catálise ácida em butanol com a adição de iões ferrosos (Avallone *et al.*, 1997).

Ayaz *et al.* (2007) realizaram um estudo para a determinação da composição química da alfarroba, nomeadamente em açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos,

minerais e compostos fenólicos. Segundo os autores, a natureza e concentração destes elementos nas frutas tem interesse devido às suas propriedades organolépticas. Quanto aos compostos fenólicos referem que são não-nutritivos mas apresentam um papel biologicamente activo no metabolismo secundário das plantas, actuando como antioxidantes, sendo que a sua distribuição no universo das plantas é bastante alargada e estão presentes em variadas comidas e bebidas de origem vegetal.

A aceitação dos frutos e vegetais para consumo humano pode ser afectada pelo seu conteúdo em fenóis. Assim, o interesse no papel dos fenóis enquanto antioxidantes na saúde humana faz com que a investigação relacionada com estes compostos seja uma realidade, nomeadamente a separação e caracterização dos diversos compostos activos de fenóis em diversos alimentos de origem vegetal (Ayaz *et al.*, 2007).

2.3.2. Constituição dos polifenóis

De acordo com (Arts & Hollman, 2005), os polifenóis das plantas derivam todos do mesmo composto intermédio, a fenilalanina, ou do seu precursor, o ácido xiquímico, através da via do ácido xiquímico nas plantas. Podem ser divididos em, pelo menos, 10 classes diferentes com base na sua estrutura química geral, tendo pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos como característica comum entre eles.

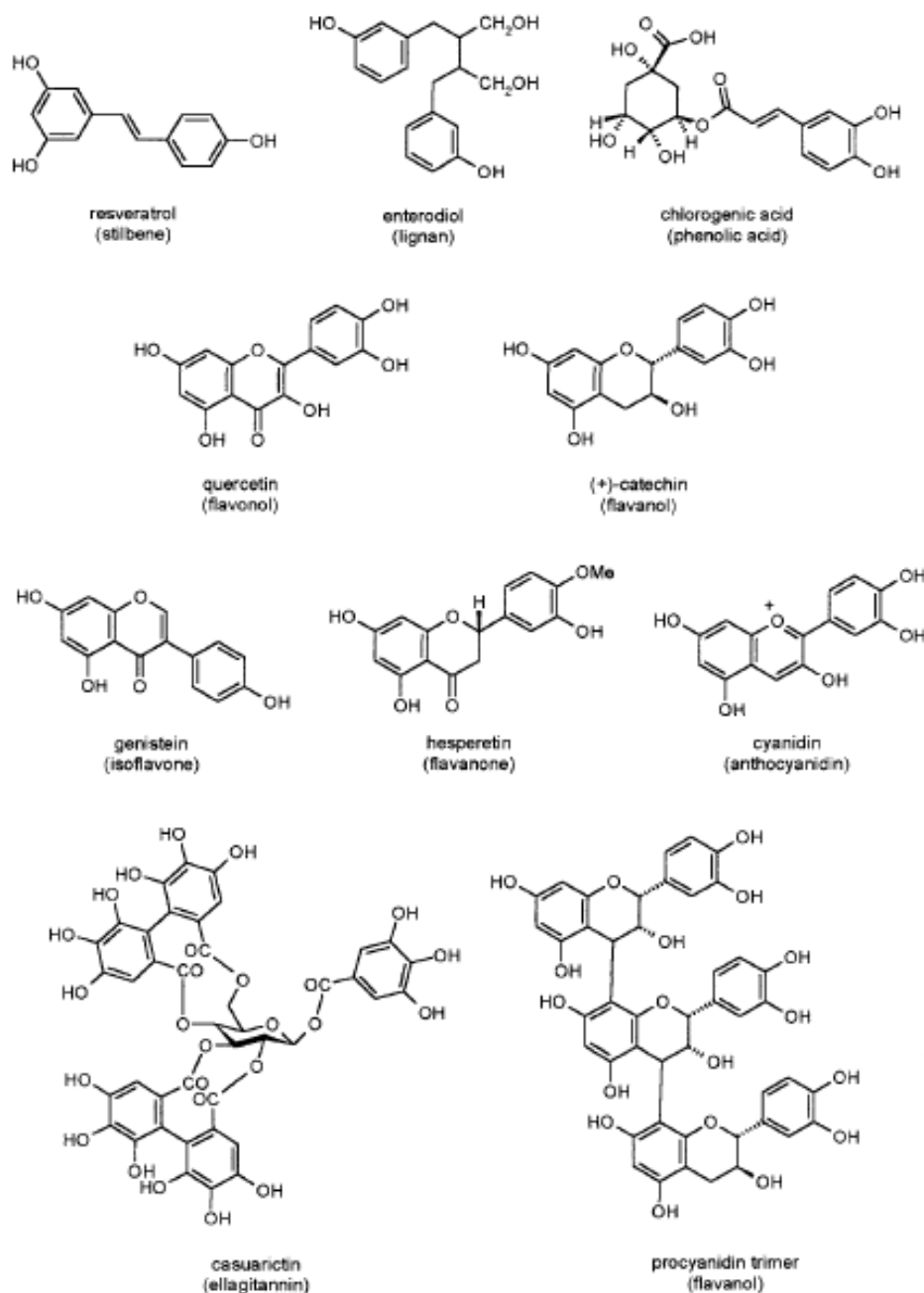


Figura 8 - Estrutura de vários polifenóis (Scalbert & Williamson, 2000)

2.3.3. Extração e purificação dos polifenóis

Ayaz *et al.* (2007) assumem que a distribuição quantitativa e qualitativa dos aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos fenólicos, açúcares e minerais característica da alfarroba acarreta uma importância vital para a avaliação da qualidade dos alimentos em si baseados, cujo consumo e distribuição no mercado tem aumentado bastante nos anos mais recentes.

O fruto tem um potencial de conteúdo em açúcar de cerca de 48-72%, assim a polpa de alfarroba pode ser uma fonte significativa de açúcares para a indústria e os compostos fenólicos de bastante importância devido à sua capacidade antioxidante (Makris & Kefalas, 2004). Sendo a alfarroba uma fonte barata de açúcares e polifenóis naturais, acabam por ter sido alvo de pouca investigação, face à sua natureza e importância, sobretudo porque também contêm aminoácidos (ácidos aspártico e glutâmico, alanina, valina, etc.) e minerais (potássio e cálcio) que desempenham um papel significativo na saúde humana.

Avallone *et al.* (1997) descrevem o processo de extracção destes compostos que seguiram no seu trabalho. Este implica diversas etapas, a primeira das quais a preparação do extracto. Para a preparação do extracto de alfarroba homogeneizar a polpa de alfarroba à temperatura ambiente usando acetona (70 ou 100%) e metanol (70%). Segue-se, então, um processo de centrifugação, com diversas repetições de 10 minutos cada uma a 5000 rpm, em que o sobrenadante é colhido e evaporado em vácuo até que fique completamente seco. Após esta etapa o extracto é diluído e separado em 10ml de água e a solução filtrada em papel Whatman nº1. Os percentuais de extracto obtidos a partir deste método são depois analisados para determinar os totais de polifenóis, proantocianidinas e elagitaninos. Da mesma forma, os extractos obtidos com acetona passam pela mesma análise para determinação dos totais destes compostos.

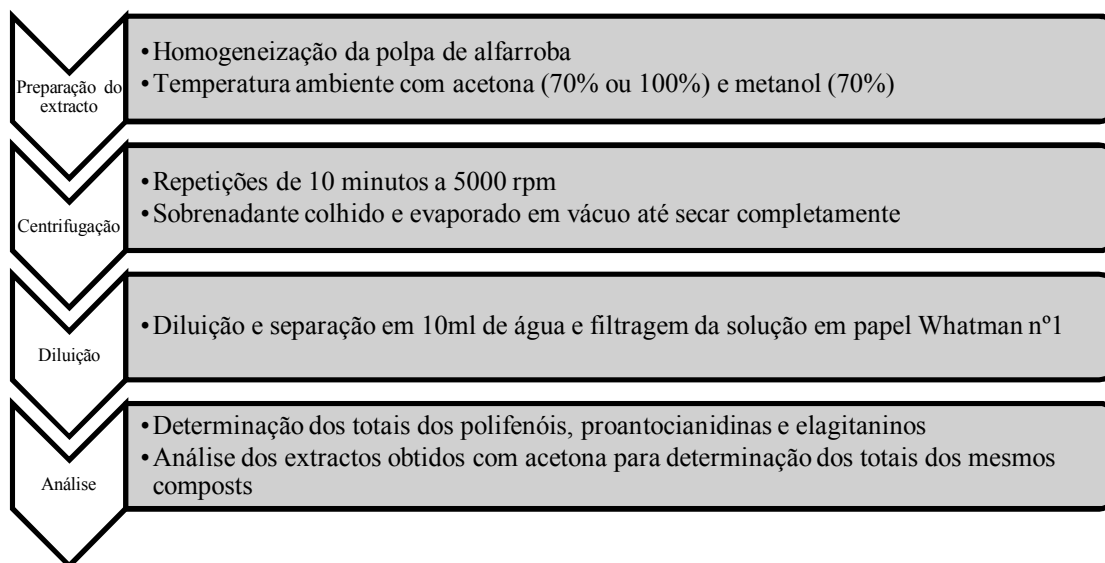


Figura 9 - Processo de extracção dos polifenóis (Adaptado de: Avallone *et al.*, 1997)

Para a análise destes compostos são realizados ensaios para cada um deles. No caso dos polifenóis, Avallone *et al.* (1997) referem o método Folin-Ciocalteu, para os polifenóis totais, através da obtenção de uma curva de calibração usando uma solução aquosa de ácido gálico (8-80 mg/ml). Para a determinação de proantocianidinas referem um ensaio de vanilina, estabelecendo uma curva de calibração com uma solução aquosa de catequina. Para estimar elagitaninos, os autores referem um método que se baseia na oxidação de ácido nitroso. No que respeita a galotaninos, estes referem um método em que são hidrolisados utilizando ácido, sendo o ácido gálico resultante analisado usando rodanina. Quanto aos taninos não extraídos, o método centra-se na dissolução da porção do resíduo numa solução de sulfato ferroso, sendo depois colocados os tubos, cobertos, num banho de água, com a absorvância lida a 530 nm e os resultados expressos em cianidinas equivalentes (emol 34,700g)/g de extracto). Neste trabalho, os autores, referem ainda que foi possível determinar os diferentes componentes de taninos presentes neste materiais e fornecer a primeira demonstração de que os produtos de alfarroba contém, no total de polifenóis, um elevado nível de taninos condensados, isto é proantocianidinas, em comparação com os taninos hidrolisáveis representados pelas elagitaninos e galotaninos.

Cada alimento contém um grande número de compostos diferentes, alguns conhecidos e quantificados, alguns menos bem caracterizados, e alguns desconhecidos

ou não mensuráveis. Muitos compostos tendem a estar presentes nos mesmos alimentos ou famílias de alimentos. A ingestão de catequinas, por exemplo, foi positivamente correlacionada com a ingestão de frutas e vegetais e seus componentes, por exemplo, a vitamina C, vitamina E, carotenóides, folato e fibras (Arts & Hollman, 2005).

Owen *et al.* (2003) realizaram ensaios com vista ao isolamento e descrição da estrutura dos principais polifenóis da alfarroba. Para extrair os compostos fenólicos usaram solventes orgânicos e, seguidamente, realizaram o fraccionamento com recurso a cromatografia de fase normal com ácido silícico, sendo as suas estruturas elucidadas com recurso a *liquid-chromatography electrospray-ionisation mass spectrometry* (LC-ESI), *nano-electrospray-ionisation mass spectrometry* (ESI-MS) e *gas-chromatography mass spectrometry* (GC-MS). Os autores conseguiram extrair um total de 24 polifenóis com uma relação de 3,94 g/kg (peso seco), dos quais o composto dominante foi o ácido gálico nas suas diversas formas (ácido gálico livre – 42%, galotaninos – 29% e metilgalato – 1%), enquanto os fenóis simples, principalmente o ácido cinâmico, perfizeram um total de 2% e os flavonóides representaram 26%.

2.3.4. Biodisponibilidade dos polifenóis

Scalbert e Williamson (2000) realizaram um trabalho acerca da biodisponibilidade dos polifenóis, nele afirmam que as principais fontes destes compostos são frutas e bebidas (sumos de fruta, vinho, chá, café, chocolate e cerveja), assim como vegetais, legumes secos e cereais, ainda que em menor escala, sendo o seu consumo total de cerca de 1g/dia. No que diz respeito à ingestão, referem os autores que a absorção intestinal pode ser elevada, no entanto, a concentração plasmática em cada individuo raramente excede 1mM após o consumo de 10-100 mg de um único composto. A medição da capacidade antioxidante do plasma sugere que mais compostos fenólicos poderão estar presentes, sobretudo na forma de metabolitos desconhecidos, produzidos quer nos tecidos quer na microflora colónica pelo que, advogam os autores, será importante aprender mais sobre estes metabolitos, em particular devido à sua potente actividade biológica. Relacionado com esta questão está ainda a explicação de que alterações na composição da microflora colónica poderão explicar largamente as grandes variações na biodisponibilidade de individuo para individuo, que também é bastante influenciada pela própria estrutura dos polifenóis, como é referido várias vezes nesta revisão.

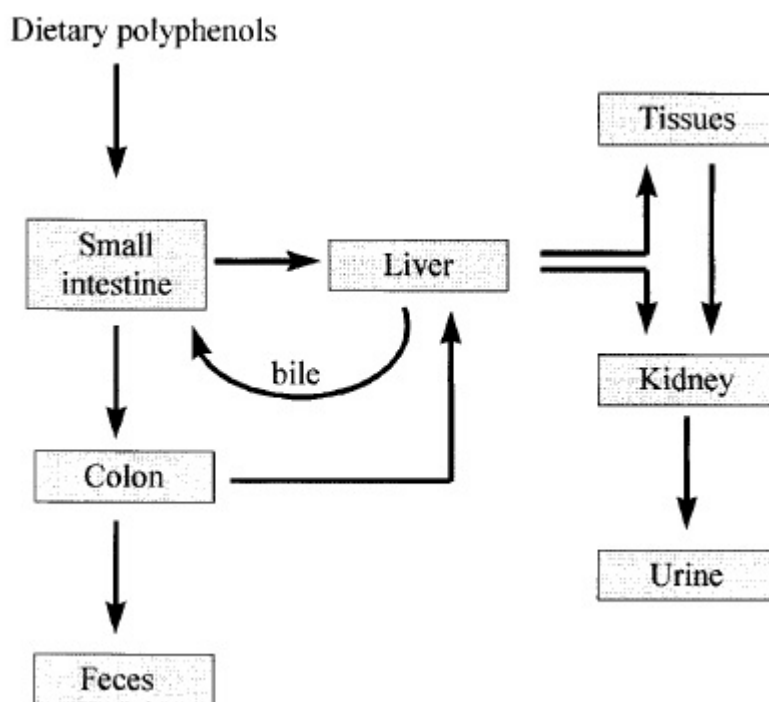


Figura 10 - Possíveis vias para os polifenóis consumidos no organismo humano (Scalbert & Williamson, 2000)

Neste artigo, Mennen *et al.* (2005), alertam que as doses experimentais em estudos podem nunca ocorrer em humanos por vários motivos, destacando que o consumo poderá nunca chegar aos mesmos níveis, por a biodisponibilidade ser baixa ou porque a dose apropriada nunca chega ao seu destino. Prosseguem dizendo que a forma do composto fenólico também é importante, uma vez que estes compostos estão presentes nos alimentos maioritariamente conjugados, excepto alguns flavonóis e isoflavonas. Para estes autores é necessário tomar em consideração estes factores na concepção de estudos nesta área uma vez que é necessário criar um modelo mais próximo possível da condição humana para uma correcta avaliação dos efeitos benéficos ou prejudiciais destes compostos. Concluem também que os níveis de exposição também dependem do modo de apresentação dos polifenóis.

2.3.5. Actividade farmacológica dos polifenóis

Arts e Hollman (2005) referem que a relevância da actividade farmacológica dos polifenóis não é suficientemente clara. Os dados disponíveis são relevantes para a evolução das doenças humanas, onde a exposição aos polifenóis é crónica e em

concentrações relativamente baixas, dependo ainda da sua biodisponibilidade e metabolismo. Dão nota de um fenómeno importante em que, após a absorção, os polifenóis estão sujeitos a um metabolismo de fase II, obtendo-se compostos metoxilados, glucoronidados e sulfatados. Olthof *et al.* (2003) realçam que a sua bioactividade pode ser influenciada, ainda que, segundo os autores, sejam necessários mais estudos sobre esta temática. Além disso, as bactérias presentes no cólon humano metabolizam polifenóis, em que os principais metabolitos são uma grande variedade de ácidos fenólicos. Como consequência, os tecidos do corpo estão expostos a concentrações elevadas destes ácidos fenólicos. O consumo de fontes importantes de flavonóides, tais como o chá na Holanda e o vinho na Dinamarca, estão associados a padrões alimentares saudáveis (Arts & Hollman, 2005).

Gruendel *et al.* (2006), estudaram os efeitos da alfarroba na dieta, como a sua influência em relação à grelina, uma hormona orexigénica, ou seja, estimulante do apetite. Dizem os autores que esta hormona é influenciada por macronutrientes mas os efeitos deste tipo de dietas, com fibras e polifenóis, eram desconhecidos. Ao investigarem as respostas de grelina pós-prandial e a ingestão do substrato verificaram que a ingestão de fibra de alfarroba diminuiu tanto a grelina acetilada, como os triglicéridos e ácidos gordos não esterificados em comparação com a refeição controlo, pelo que os resultados deste estudo demonstraram que o consumo de alfarroba poderá exercer efeitos benéficos no peso corporal e absorção de energia.

Num outro estudo também conduzido por Gruendel *et al.* (2007), os resultados do seu trabalho anterior (Gruendel *et al.*, 2006) foram complementados, desta feita relativamente aos níveis de glucose. Segundo os autores, o consumo de fibra dietética está associado a uma melhoria na homeostasia da glucose, enquanto os polifenóis apresentam tanto efeitos benéficos como não benéficos no metabolismo da glucose e da insulina. Assim, considerando que com formulações diferentes os resultados de 2006 poderiam ser diferentes, investigaram as interações da alfarroba e seus constituintes com a glucose, insulina e grelina em humanos saudáveis em combinação com uma carga de glucose. Após os seus ensaios verificaram que a grelina plasmática não se alterou significativamente, enquanto a glucose pós-prandial e a resposta à insulina aumentaram, sugerindo que a administração de alimento à base de alfarroba numa solução aquosa de glucose deteriora o controlo glicémico.

Nohynek *et al.* (2006), conduziram ensaios onde analisaram os compostos fenólicos de frutos silvestres, tais como morangos, framboesa ou amoras, e os seus efeitos antimicrobianos, assim como os seus mecanismos contra graves patogénicos humanos. Neste estudo verificaram que a bactéria mais sensível aos compostos fenólicos foi a *Helicobacter pylori*, juntamente com *Bacillus cereus*. No que diz respeito a *Campylobacter jejuni* e *Candida albicans* apenas foram inibidos pelos extractos fenólicos da framboesa, morango e amora, ricos em elagitaninos. A amora usada neste estudo foi, segundo os autores, a fonte de polifenóis que melhores resultados apresentou. O seu extracto apresentou fortes efeitos microbicidas contra todas as estirpes analisadas, ainda que algumas células viáveis de *Salmonella* tenham sido encontradas aderidas ao extracto de amora. No entanto as células de *Staphylococcus aureus* aderidas ao mesmo extracto já se encontravam mortas. Os extractos fenólicos de amora e framboesa foram responsáveis pela desintegração da membrana das estirpes de salmonela, sendo o ácido gálico responsável pela permeabilização da membrana. Esta propriedade é sobretudo evidente considerando que após um ano em que os frutos estiveram congelados continuaram a apresentar a sua capacidade microbicida, apesar de terem diminuído as quantidades de compostos fenólicos.

2.3.6. Mecanismo farmacológico

Em 1991, Gali *et al.*, referiam como desconhecido o mecanismo por trás do qual o ácido tânico, o ácido elágico, o ácido gálico e seus derivados, inibem a ornitina descarboxilase na sua actividade indutora da tetradecanoilforbol acetato (TPA), um potente promotor tumoral. No entanto, com os resultados obtidos foi-lhes possível afirmar que a capacidade do ácido tânico para inibir todas as respostas da ornitina descarboxilase a diferentes promotores tumorais sugere que, apesar de não específicos para a enzima alterada da TPA, os polifenóis vegetais poderiam ser causadores da inibição do mecanismo, através do qual os vários promotores tumorais agem. Afirmam ainda que o ácido tânico inibe o início da formação de tumores e a completa carcinogénese, concluindo que, em conjunto com outros fenóis vegetais, podem ser inibidores universais de carcinogénese multi-estádio.

Entre os dados encontrados no seu projecto, Corsi *et al.* (2002), é destacada a presença de substâncias que exercem um bom efeito anti-proliferativo da linha celular

T1 em extractos aquosos derivados da vagem de alfarroba. Consequentemente, os autores decidiram verificar se extractos de outras partes da planta teriam os mesmos efeitos, nomeadamente as folhas, julgando serem as melhores fontes destas substâncias, em particular polifenóis. Chegaram à conclusão que, de facto, também as folhas apresentavam inibição da proliferação daquelas células e com um efeito ainda mais efectivo que o extracto da vagem. Segundo os autores, este efeito estará relacionado com a indução da apoptose das células, uma vez que tanto os extractos de vagem como de folhas, ainda que com diferenças, mostraram um aumento significativo da actividade da caspase-3 comparando com as células de controlo.

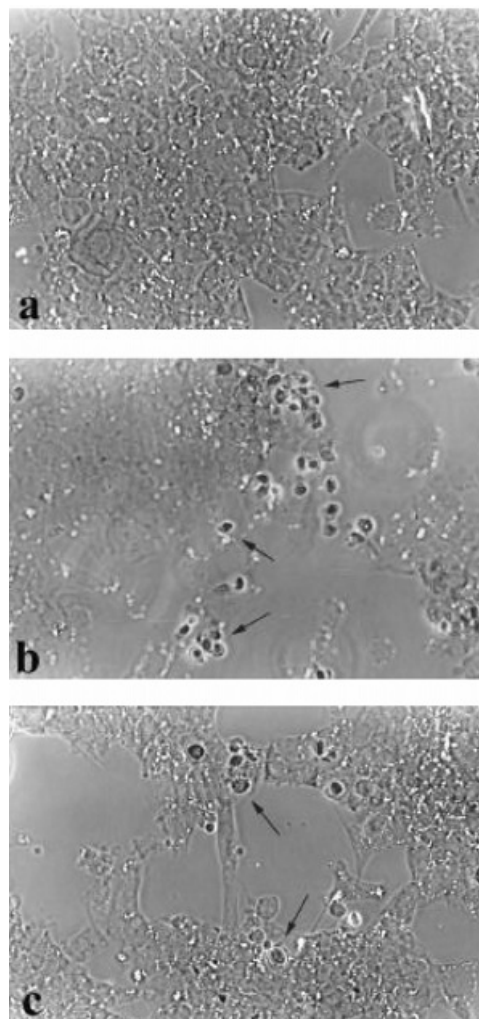


Figura 11- Efeito do extracto aquoso das vagens e folhas de alfarroba na apoptose no carcinoma hepático das células da linha T1 em ratos. Tratamento com extracto de folhas (b) ou tratamento com extracto de vagens (c), que causa a fragmentação do ADN em muitas células, como demonstrado nos núcleos escurecidos, indicados nas setas, indicando um aumento nos processos de apoptose., ao contrário das células não tratadas (a), sem escurecimento (Corsi *et al.*, 2002).

Comparando estes resultados com os resultados conhecidos dos extractos de chás verdes, ricos em catequinas, em inibirem a proliferação celular, os autores resumem que estes efeitos deduzidos a partir destes extractos poderão estar primariamente relacionados com a presença de galotaninos e ácido gálico. Nos resultados deste projecto pode ainda ser apontada a presença de maiores quantidades de flavonóides, como epigallocatequina-3-galato, epicatequina-3-galato, assim como ácidos gálicos nos extractos de folhas em comparação com os extractos de vagem. Ainda que os autores apontem os seus resultados como sendo uma primeira etapa de uma série de estudos necessários, à que analisar a base molecular que está por detrás deste efeito. Considerando também que poderão ser uteis para o desenvolvimento de futuras estratégias contra a actividade celular mitótica e consequentemente contra a progressão de cancro.

Zunft *et al.* (2003), no seu estudo sobre o efeito da alfarroba na diminuição do colesterol em pacientes hipercolesterolémicos, apresentam resultados em que o rácio marginal de LDL:HDL diminuiu, sendo mais baixo no grupo que consumiu a fibra que no grupo controlo. De notar ainda que estes efeitos foram mais pronunciados em sujeitos femininos que masculinos e dentro do grupo feminino houve ainda redução de triglicéridos. Podem estes efeitos ser actividade adicional ao benefício da redução de colesterol pela alfarroba.

Galati e O'Brien (2004), nos seus estudos relacionados com os efeitos dos polifenóis em relação ao cancro, referem que a sua actividade quimopreventiva estará relacionada com a sua capacidade em inibir a fase I e induzir a fase II cancerígena, induzindo enzimas que metabolizam a carcinogénese. Também inibem a fase de promoção da carcinogénese através da inibição da formação de enzimas que originam radicais livres de oxigénio. Bem como de enzimas que contribuem para a síntese de ADN e mimetizam ATP inibindo as proteínas-quinases que contribuem para a proliferação do sinal de transdução. Concluem, ainda, os autores, que poderão prevenir o desenvolvimento tumoral induzindo a apoptose das células tumorais através da inibição da ADN topoisomerase II e da regulação da p53 ou causando toxicidade mitocondrial, que inicia a apoptose mitocondrial.

Gandhi e Nair (2005), fazem referência a estudos farmacocinéticos, nomeadamente o de Shahrzad *et al.* (2001), para o ácido elágico que indicam que este é

rapidamente absorvido e eliminado, sendo o seu tempo de semivida médio de $1,19 \pm 0,07$ e $1,06 \pm 0,06$ h, após a administração de comprimidos de ácido gálico ou chá preto, respectivamente, em seres humanos. Referem também que a sua ruptura metabólica resulta em produtos de ácido gálico que são detectáveis na urina.

Uma outra aplicação para os compostos fenólicos, nomeadamente ácido gálico e metilgalato, diz respeito à inibição da proliferação de bactérias orais. Kang *et al.* (2008) estudaram estes compostos neste âmbito e o efeito foi positivo em todos os microrganismos testados (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. Viscosus*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. varius*). O mecanismo por detrás desta acção, referem os autores, poderá estar associado a propriedades anti-adesão.

2.3.7. Aplicações dos polifenóis

2.3.7.1. Anticarcinogénicos

Gali *et al.* (1991), já haviam estudado os efeitos dos compostos fenólicos, o ácido elágico e outros fenóis vegetais, o seu relatório indicava que além de antioxidantes também teriam actividade anticarcinogénica e antimutagénica, assim como também inibiam de forma acentuada a actividade de um marcador bioquímico da promoção tumoral. Especificam ainda a indução da actividade da ornitina descarboxilase, uma enzima envolvida no ciclo da ureia e a primeira limitadora de rácio na biossíntese de poliamina e na promoção tumoral. Estes autores nos resultados apresentados dos seus ensaios que, após a iniciação e 20 semanas de promoção da 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), um composto imunossupressor e carcinogénico, a aplicação de 5 nmol de taninos, 20 minutos antes de cada tratamento de promoção cancerígena inibiu a incidência e quantidade de papilomas cutâneos em 49 e 85%, respectivamente.

Corsi *et al.* (2002), refere que nos anos anteriores ao seu trabalho, já havia sido dedicada alguma atenção à capacidade dos constituintes da dieta, como as epicatequinas (compostos polifenólicos presentes em grandes quantidades, por exemplo, no chá verde, algo que Arts e Hollman (2005) também fazem referência), para actuar como agentes preventivos de cancro e anticancerígenos.

Gomes *et al.* (2003) estudaram alguns compostos fenólicos e sua actividade anticancerígena, quatro compostos dihidroxilados (catecóis) e três compostos trihidroxilados análogos, a saber, ácido dihidroxibenzoico (DHB), ácido dihidroxifeniletanoico (DHPE), ácido hidrocafeico (DHPP), ácido trans-cafeico (DPPE) e ácido gálico (THB), ácido etanóico (THPE) e ácido propanóico (THPP), respectivamente. Os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dependentes da dosagem e do tempo dos distintos compostos foram analisados, assim como a sua toxicidade para com células saudáveis. Com os resultados obtidos, estes autores, referem que encontraram alguns factos que relacionam a estrutura dos compostos com a actividade antitumoral dos mesmos, determinada pelas suas propriedades antioxidantes e/ou pro-oxidantes (dependentes da sua concentração e condições envolventes). Assim, os compostos trihidroxilados apresentaram maior actividade citotóxica, tal como um maior efeito antiproliferativo em comparação com os compostos dihidroxilados, como aliás também indicam os estudos de Salucci *et al.* (2002).

Gomes *et al.* (2003) demonstram com os seus resultados que alguns dos compostos por si analisados são mais eficientes como agentes antiproliferativos e citotóxicos que outros, sendo que o DHPP, DHPE e THPE apresentam um efeito mais marcado contra o adenocarcinoma do cérvix (HeLa), o THPP contra o cancro da mama (MDA-MB-231) e o THB contra a linha leucémica (MOLT-3).

2.3.7.2. Antioxidantes

Avallone *et al.* (1997) destacam as propriedades antioxidantes dos taninos, sugerindo que terão interesse como agentes terapêuticos em doenças degenerativas relacionadas com radicais livres, sendo que, até então, a grande quantidade de proantocianidinas, responsáveis pelo excesso de adstringência, seriam uma limitação no uso de produtos à base de alfarroba. Esta limitação das proantocianidinas pode ser atenuada e esse efeito diminuído através do método por si usado, ressaltando que tendo o seu método sido pioneiro ao caminhar nesse sentido existem outros que também eles poderão ser utilizados para o mesmo fim.

Arts e Hollman (2005), no seu artigo intitulado “Polifenóis e risco de doenças em estudos epidemiológicos”, referem que os polifenóis das plantas fazem parte de um grande grupo de antioxidantes naturais e são sérios candidatos a explicarem os efeitos

de protecção atribuídos às plantas e vegetais contra doenças cardiovasculares e cancro. Os autores sugerem que os estudos epidemiológicos são úteis para a avaliação dos efeitos relacionados com a exposição fisiológica prolongada a polifenóis na saúde humana, no entanto os dados relativos ao conteúdo em polifenóis dos mais variados alimentos são escassos. Esse artigo refere ainda que estudos existentes sugerem, de facto, que esses efeitos proteccionistas existem, em relação àquelas doenças. Dos vários tipos de cancro estudados, os efeitos protectores foram relatados apenas para o cancro de pulmão em relação à ingestão de flavonóides e flavona.

Arts e Hollman (2005) sugerem que de entre as várias hipóteses que poderão explicar estes efeitos benéficos do aumento de consumo de vegetais e frutas, uma das mais atractivas diz respeito à composição dos mesmos em nutrientes e micronutrientes, em que os polifenóis são sérios candidatos à responsabilidade desse efeito, sobretudo em dietas ricas nestes alimentos.

2.3.7.3. Hipocolesterolemiantes

Zunft *et al.* (2003), no seu estudo sobre o efeito da alfarroba na diminuição do colesterol em pacientes hipercolesterolémicos, apresentam resultados que demonstram que a ingestão de fibra de alfarroba pode reduzir as concentrações de LDL e colesterol total, sendo esta redução de interesse clínico. Os autores fazem referência à importância do colesterol sanguíneo como um factor de risco para doenças cardiovasculares, consequentemente, afirmam que acções ao nível da dieta para diminuir o nível de colesterol no sangue são extremamente importantes na prevenção e no tratamento deste tipo de doenças. Indicam também as fibras solúveis, tais como a aveia, psílio, pectina e goma de guar como havendo sido consideradas efectivas no tratamento de hipercolesterolemia, enquanto fibras insolúveis como o trigo não aparentam ter efeito directo. Com estas premissas realizaram o seu estudo, nele comprovaram que o consumo de fibra de alfarroba isolada da polpa das vagens reduziu acentuadamente o colesterol total e a LDL. Apesar destas conclusões, devido à amostra reduzida e à grande variabilidade individual na resposta ao colesterol com os efeitos encontrados, os autores sugerem que mais investigação deve ser realizada, sobretudo no que diz respeito aos mecanismos e às respostas dependentes da dose que originaram a observada redução de colesterol.

2.3.7.4. Cardiologia

Com os dados recolhidos no seu estudo, Arts e Hollman (2005), sugerem que os dados referentes às doenças cardiovasculares indicam efeitos protectores quando existe um consumo elevado de flavonóis, flavonas e, possivelmente, catequinas. Além destes referem ainda um outro achado que diz respeito a doenças da artéria coronária em que os estudos realizados na Europa continental apresentam resultados díspares daqueles realizados em outros locais, como os Estados Unidos. Segundo os autores, as explicações para este fenómeno poderão estar associadas a estilos de vida mais ou menos saudáveis, sem que, no entanto, tenham encontrado uma explicação satisfatória e refiram que seja interessante realizar pesquisas para entender estas diferenças.

2.3.7.5. Radioprotectores

Gandhi e Nair (2005), induziram danos celulares através de radiação gama e verificaram se o ácido gálico agia como protector de ADN e da membrana celular. A exposição à radiação ionizante produz uma variedade de lesões no ADN, tais como quebras de cadeia simples ou dupla, ADN-ADN e ligações cruzadas de proteína de ADN em conjunto com danos para as bases de nucleótidos. Após avaliarem estas lesões provocadas pela radiação, com efeitos mutagénicos, carcinogénicos e letais, verificaram que a presença de ácido gálico durante a irradiação resultou na redução do desaparecimento da forma de plasmídeo *covalently closed circular*, indicando que a sua presença resulta na protecção de ADN contra a radiação *in vitro*. Obtiveram também resultados semelhantes, evidenciando a protecção conferida pelo ácido gálico por reduzir a formação de MDA, um conhecido mutagénico em células bacterianas e de mamíferos e cancerígeno em ratos, em diferentes tecidos de ratos expostos à radiação, conferindo assim a capacidade protectora ao ácido gálico. Estes autores referem que já haviam existido várias tentativas para elaborar um radioprotector ideal mas, embora muitos deles tenham mostrado uma boa capacidade radioprotectora, falharam na aplicação a seres humanos devido à alta toxicidade.

Estes autores, advertem que, apesar de os benefícios médicos da exposição a raios-X e tomografia computadorizada serem maiores que o risco associado, seria benéfico criar uma “bebida radioprotectora” (expressão usada pelos autores), que incluiria ácido gálico, vitamina C e E, melatonina, extractos herbais relatados como tendo efeitos

radioprotectores, que seria ingerida previamente a procedimentos de diagnóstico que envolvem radiação, mamografias de rotina, entre outros. Tal sugestão deve-se ao facto de o ácido gálico ser relativamente barato e ter uma boa estabilidade à temperatura ambiente e, como os seus resultados indicam, ter uma boa capacidade radioprotectora. Assim, além das vítimas de acidentes nucleares, pessoal de limpeza, pessoal de resgate e pessoal de defesa durante a guerrilha nuclear, a necessidade de protecção dos seres humanos contra os efeitos deletérios da radiação também devem ser uma preocupação.

2.3.7.6. Antimicrobianos

Como referido anteriormente, uma outra aplicação para os compostos fenólicos, nomeadamente ácido gálico e metilgalato, diz respeito à inibição da proliferação de bactérias orais. Kang *et al.* (2008), estudaram estes compostos neste âmbito e o efeito foi positivo em todos os microrganismos testados (*S. mutans*, *S.sobrinus*, *A. Viscosus*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. varius*). Os autores referem que em outros estudos já haviam sido obtidos resultados semelhantes, em que baixa dosagem destes compostos foi suficiente para inibir o crescimento de três bactérias periodontopáticas incluindo *P. gingivalis*. Os autores referem que as bactérias usadas no seu estudo são consideradas como tendo um papel bastante importante em periodontites e infecções dentoalveolares, assim, é também importante controlar estas bactérias de forma a prevenir doenças periodontais. Tanto o ácido gálico como o metilgalato evidenciaram efeitos antimicrobianos significativos tanto contra bactérias cariogénicas como periodontopáticas.

2.3.7.7. Doença de Alzheimer

Uma possível aplicação dos polifenóis é a que Singh *et al.* (2008) referem no seu trabalho relacionado com a Doença de Alzheimer. Neste trabalho referem que estes compostos têm o potencial de ser inestimáveis agentes neuroprotectores devido à sua capacidade de influenciar e modular vários processos celulares, tais como sinalização, proliferação, apoptose, balanço de oxidação-redução e diferenciação. Apesar de tudo, tal como outros autores, referem que são necessários mais estudos para determinar a sua absorção, biodisponibilidade e ainda, para esta área em particular, a sua capacidade em atravessar a barreira hematoencefálica. Ainda assim, fazem referência a documentação relacionada com a actividade neuroprotectora em vários modelos de doenças

neurodegenerativas *in vitro* e *in vivo* que, no entanto, admitem, seria arriscado extrapolar para humanos sem os ensaios clínicos apropriados em pacientes afectados por perdas neuronais extensas e irreversíveis.

Outro problema referido pelos autores é que os estudos que têm sido conduzidos são feitos numa base de curta-duração, pelo que seria desejável que fossem realizados estudos numa base de longa-duração para que fosse possível determinar os reais efeitos dos compostos fenólicos em doenças neurodegenerativas de desenvolvimento lento como é o caso da Doença de Alzheimer.

Concluem, então, que a multiplicidade de acções biológicas realizadas pelos polifenóis acarretam grandes expectativas como potenciais agentes terapêuticos ou profilácticos em doenças neurodegenerativas, o que poderá ganhar suporte com a compreensão dos efeitos das espécies reactivas de oxigénio nas funções moleculares e celulares básicas das várias células nervosas cerebrais e como afectam a fisiopatologia deste tipo de doenças, nomeadamente o impacto que estas espécies reactivas de oxigénio têm na produção de diferentes neurotrofinas, neurotransmissores e esteróides no cérebro, bem como a sua possível modulação por polifenóis, que poderão abrir novas perspectivas no tratamento destas doenças.

Nohynek *et al.* (2006), indicam, em consequência do seu estudo, que os compostos fenólicos inibem agentes patogénicos do tracto gastrointestinal, podendo, assim, ser usados como agentes terapêuticos ou como compostos para desinfectar contra as bactérias por si estudadas (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. Viscosus*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. varius*). Já Olasupo *et al.* (2003), haviam chegado a semelhantes conclusões.

2.3.8. Efeitos da utilização dos polifenóis

Enquanto a maioria dos fenóis/flavonóides são considerados seguros, a terapia quimopreventiva ou terapia fenólica/flavonóide deve ser bem avaliada. Segundo Galati e O'Brien (2004), existem relatos de interacções tóxicas entre fármacos e flavonóides com falências hepáticas, dermatites por contacto, anemia hemolítica e questões relacionadas com estrogénio, como saúde reprodutiva masculina e cancro da mama associadas a dietas com consumo ou exposição a estes compostos.

Galinhas e ratos alimentados com produtos baseados em alfarroba apresentam redução da taxa de crescimento, o que sugere que os taninos poderão ser considerados factores depressivos do crescimento (Avallone *et al.*, 1997).

2.3.9. Contra-indicações

Para Mennen *et al.* (2005) o risco de consumir altas doses de polifenóis a partir de alimentos naturalmente ricos nestes compostos é baixo. No entanto, alertam para que se tenha em consideração o efeito negativo de outros ingredientes nestes alimentos, como gorduras no café que aumentam o colesterol, álcool no vinho e gordura no chocolate. Outro alerta que lançam é que os alimentos podem ser suplementados com polifenóis mas deve-se ter a certeza que quem consome estes alimentos são a população alvo para o qual foram pensados e não faixas de população de risco, como as crianças e as mulheres grávidas. Estes compostos podem ser usados para a concepção de suplementos dietéticos, no entanto, desta forma existe o risco de facilmente se atingir níveis elevados de consumo. Nestes casos, referem os autores, testes toxicológicos para garantir níveis adequados de consumo poderão ser aconselháveis. Assim, referem que os mesmos testes efectuados para a segurança de preparados botânicos para uso em comida e suplementos alimentares podem ser aplicados para os polifenóis, dependendo na natureza do produto contendo os polifenóis (seja alimento, extracto alimentar ou composto puro) e do potencial uso proposto que poderá aumentar significativamente a exposição.

Finalmente, Mennen *et al.* (2005), referem que os efeitos dos polifenóis em humanos com doenças crónicas, usando de alimentos ou suplementos com doses nutricionais ou farmacológicas de polifenóis, devem ser avaliados, não sem antes serem realizados ensaios que quantifiquem as dosagens, por forma a prevenir estudos que contrariem a ética. Até chegar a essa fase, os autores advertem que é necessário acumular dados substanciais com exames laboratoriais, *in vitro* ou em animais, em estudos epidemiológicos recorrendo apenas a doses e formas relevantes de forma a chegar a aferir os potenciais efeitos benéficos do consumo de polifenóis como um todo ou determinados polifenóis em particular.

2.3.10. Toxicidade

Como referido anteriormente, Gomes *et al.* (2003) estudaram a actividade de alguns compostos fenólicos contra a actividade cancerígena, quatro compostos dihidroxilados (catecóis) e três compostos trihidroxilados análogos, a saber, ácido dihidroxibenzoico (DHB), ácido dihidroxifeniletanoico (DHPE), ácido hidrocafeico (DHPP), ácido trans-cafeico (DPPE) e ácido gálico (THB), ácido etanóico (THPE) e ácido propanóico (THPP), respectivamente. Nas análises efectuadas por estes autores nenhum deles revelou toxicidade relevante para com células saudáveis, até porque, referem os autores, o seu efeito antiproliferativo e/ou citotóxico para com estas células, quando presente, foi completamente revertido após remoção farmacológica.

Com os resultados apurados no seu trabalho, Gomes *et al.* (2003), concluíram que a actividade antitumoral dos compostos fenólicos, objecto da sua análise, apresenta uma grande dependência das características da conformação, que também irão determinar as suas propriedades antioxidantes ou pro-oxidantes. Desta forma aconselham que novos fármacos desenhados para o tratamento de cancro devem ter estas conclusões em consideração, sobretudo porque pequenas alterações na sua estrutura são suficientes para modificar as propriedades antiproliferativas e citotóxicas destes compostos, outra característica desejável é apresentarem baixa toxicidade para com células saudáveis.

Galati e O'Brien (2004), no seu extenso trabalho relacionado com a toxicidade dos polifenóis, menciona em particular os flavonóides e outros fenóis presentes na nossa dieta. Sendo estas substâncias componentes naturais da nossa dieta e, com o aumento do interesse em medicinas alternativas, é lógico existir também um aumento do interesse neste tipo de temáticas pela população em geral. As propriedades benéficas relatadas destes compostos são conhecidas, destacando-se os seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticarcinogénicos. Os compostos flavonóides são vendidos como suplementos dietéticos ou medicamentos herbais que apresentam uma grande variedade de efeitos terapêuticos não-tóxicos. No entanto, segundo os autores, estas afirmações carecem de confirmação laboratorial com ensaios clínicos que atestem a sua eficácia ou o seu potencial tóxico. Foi com esse objectivo que desenvolveram o seu trabalho.

Para estes autores, devido ao crescente interesse em medicina alternativa, os produtos à base de plantas são cada vez mais recorrentes e indicam que, pelo menos, 10% da população em geral e 30-70% das pessoas com alguma doença em particular, ingerem este tipo de produtos.

Galati e O'Brien (2004), salientam que uma vez que os suplementos dietéticos não são classificados como fármacos, e assim não necessitam de aprovação das instâncias reguladoras em diversos países, os seus potenciais tóxicos e interações medicamentosas não são avaliados cuidadosamente. Assim, a partir da sua revisão, ficou claro para estes autores que existem potenciais problemas de segurança se grandes doses de compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides e flavonas, forem consumidas diariamente. De acordo com estes autores, a toxicidade destes compostos está relacionada com os anéis de fenol contidos nos flavonóides, que na oxidação por peroxidases, comportam radicais fenoxil que são citotóxicos, co-oxidam lípidos não-saturados, glutatião, NADH, ascorbato e ácidos nucleicos, causando ainda a formação de elementos reactivos de oxigénio e toxicidade mitocondrial. Quanto aos flavonóides contendo anéis de catecol fazem referência a resultados que indicam que estes compostos formam outros compostos electrófilos intermediados por quinonas que se ligam ao ADN, proteínas e glutatião. Espaço ainda para a referência à hepatotoxicidade, relatada que foi induzida em ratos por compostos fenólicos, como por exemplo epigallocatequinas, encontrados em chá verde e outros suplementos dietéticos ou medicamentos herbais.

Gandhi e Nair (2005) analisam as possibilidades do ácido gálico para aplicação em humanos devido à sua não-toxicidade, grande disponibilidade e estabilidade, sendo que pode ser ingerido oralmente, torna-o relativamente barato, concluindo que será um dos compostos de eleição para a utilização em larga escala para efeitos de radioprotecção em situações de emergência radiológica. Estas conclusões são também sustentadas com o aumento da frequência de indução de micronúcleos em leucócitos sanguíneos periféricos de trabalhadores de centrais nucleares revelando efeitos deletérios da exposição à radiação. Outras das actividades que também acarretam riscos nesta área são as viagens no espaço onde existe risco de exposição a radiação ionizante e ao nível do pessoal médico que apesar das medidas de protecção como o vestuário também eles não estão imunes.

No seu trabalho relativo aos efeitos antimicrobianos contra bactérias orais, (Kang *et al.*, 2008) referem que a segurança do metilgalato e do ácido gálico para a mucosa oral ainda não foi testada. No entanto, referem que não foram observados efeitos citotóxicos óbvios, pelo que esta aplicação destes compostos poderá ser recomendada. Advertem, no entanto, que concentrações de 4 e 8 mg/ml de ácido gálico apresentam citotoxicidade.

3. Conclusão

Com esta revisão é possível verificar que a alfarroba é um fruto com uma importância bastante grande na sociedade e na história da humanidade, nomeadamente nos países da bacia do Mediterrâneo, de onde é originária. Esta importância tem crescido e, por isso, cada vez são mais os estudos efectuados para que o conhecimento deste fruto seja cada vez maior e se possa tirar o máximo proveito das suas características.

É sabido que cada vez mais se assiste ao envelhecimento da população e a hábitos cada vez mais sedentários e que isso traz um aumento da prevalência e incidência de doenças cardíacas, degenerativas, assim como distúrbios alimentares. Estes factos fazem com que o interesse em áreas como a oncologia ou a Doença de Alzheimer aumente e que o investimento na investigação por formas alternativas de tratamento acompanhe esse aumento de interesse.

Fica claro que estudos nesta área são cada vez mais importantes e os resultados obtidos até ao momento são encorajadores e comprovam as propriedades antimutagénicas, anticarcinogénicas e antioxidantes, entre outras, dos componentes que podem ser extraídos da alfarroba.

4. Bibliografia

Aggett, P. J., Agostoni, C., Goulet, O., Hernell, O., Koletzko, B., Lafèber, H. L., Weaver, L. T. (2002). Antireflux or antiregurgitation milk products for infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 34, 496-498.

Arts, I. C., e Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81, 317S-325S.

Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., e Monzani, A. (1997). Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of food composition and analysis*, 10, 166-172.

Ayaz, F. A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P. J., Alaiz, M., Sanz, C., Grúz, J., Strnad, M. (2007). Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30, 1040-1055.

Batlle, I., e Tous, J. (1997). Carob tree: *Ceratonia siliqua* L. *Carob tree: Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Beneke, C. E., Viljoen, A. M., e Hamman, J. H. (2009). Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. *Molecules*, 14, 2602-2620.

Carafa, M., Marianecci, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Di Meo, C., Di Meo, C., Alhaique, F., Matricardi, P., Coviello, T. (2011). A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: preparation and characterization. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14, 336-346.

Catarino, F., Correia, O., Webb, E., e David, M. (1981). Morphological and physiological responses of the Mediterranean evergreen sclerophyll, *Ceratonia siliqua*, to different light intensities *Components of productivity of Mediterranean-climate regions Basic and applied aspects: Tasks for Vegetation Science*, 4, 5-15.

Chourasia, M., e Jain, S. (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharm Sci*, 6, 33-66.

Civas, A., Eberhard, R., Le Dizet, P., e Petek, F. (1984). Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted alpha-D-galactosidase and beta-D-mannanase. *Biochem. J*, 219, 857-863.

Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., e Baraldi, M. (2002). Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73(7), 674-684.

Dionísio, M., e Grenha, A. (2012). Locust bean gum: exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(3), 175.

El Batal, H., e Hasib, A. (2013). Optimization of Extraction Process of Carob Bean Gum Purified from Carob Seeds by Response Surface Methodology. *Chemical and Process Engineering Research*, 12, 1-8.

Fletcher, R. (1997). Carob agroforestry in Portugal and Spain. *Australia New Crops Newsletter*, 7, 13.

Galati, G., e O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.

Gali, H. U., Perchellet, E. M., e Perchellet, J.-P. (1991). Inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis in vivo. *Cancer research*, 51(11), 2820-2825.

Gandhi, N. M., e Nair, C. K. K. (2005). Protection of DNA and membrane from gamma radiation induced damage by gallic acid. *Molecular and cellular biochemistry*, 278(1-2), 111-117.

Gomes, C. A., Girão da Cruz, T., Andrade, J. L., Milhazes, N., Borges, F., e Marques, M. P. M. (2003). Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *Journal of medicinal chemistry*, 46(25), 5395-5401.

Gruendel, S., Garcia, A. L., Otto, B., Mueller, C., Steiniger, J., Weickert, M. O., Koebnick, C. (2006). Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *The Journal of nutrition*, 136(6), 1533-1538.

Gruendel, S., Otto, B., Garcia, A. L., Wagner, K., Mueller, C., Weickert, M. O., Koebnick, C. (2007). Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans. *British Journal of Nutrition*, 98(01), 101-105.

Hakim, L., Islam, M., Mamun, A., Ahmed, G., e Khan, R. (2010). Clonal propagation of Carob (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae). *Bangladesh Journal of Botany*, 39(1), 15-19.

Hong, T., Linington, S., e Ellis, R. (1996). Seed Storage Behaviour: a Compendium. *Handbooks for Genebanks: No. 4. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy*.

Jain, A., Gupta, Y., e Jain, S. K. (2007). Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon. *Journal Pharmacological Sciences*, 10(1), 86-128.

Kang, M.-S., Oh, J.-S., Kang, I.-C., Hong, S.-J., e Choi, C.-H. (2008). Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *The Journal of Microbiology*, 46(6), 744-750.

Khoshoo, V., Ross, G., Brown, S., e Edell, D. (2000). Smaller volume, thickened formulas in the management of gastroesophageal reflux in thriving infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 31(5), 554-556.

Macedo, R. (2006). Frutos frescos e secos: Alfarroba. *Anuário Vegetal 2006*. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas: Gabinete de Planeamento e Políticas. Castel, Lisboa, Portugal.

Makris, D. P., e Kefalas, P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, 42(2), 105-108.

Malik, K., Arora, G., e Singh, I. (2011). Locust bean gum as superdisintegrant—Formulation and evaluation of nimesulide orodispersible tablets. *Polimery w medycynie*, 41(1), 17-28.

Mathur, V., e Mathur, N. (2005). Fenugreek and other lesser known legume galactomannan-polysaccharides: scope for developments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(7), 475.

Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., e Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 326S-329S.

Miyazawa, R., Tomomasa, T., Kaneko, H., e Morikawa, A. (2004). Effect of locust bean gum in anti-regurgitant milk on the regurgitation in uncomplicated gastroesophageal reflux. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 38(5), 479-483.

Moin, A., e Shivakumar, H. (2010). Formulation of sustained-release diltiazem matrix tablets using hydrophilic gum blends. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), 283-291.

Mujoriya, R., DHAMANDE, K., WANKHEDE, U. R., e ANGURE, S. (2011). A review on study of buccal drug delivery system. *Innovative Systems Design and Engineering*, 2(3), 24-35.

Nohynek, L. J., Alakomi, H.-L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K.-M., e Puupponen-Pimiä, R. H. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer*, 54(1), 18-32.

Olasupo, N., Fitzgerald, D., Gasson, M., e Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in applied microbiology*, 37(6), 448-451.

Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., e Katan, M. B. (2003). Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *The Journal of nutrition*, 133(6), 1806-1814.

Owen, R., Haubner, R., Hull, W., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., e Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1727-1738.

Petit, M., e Pinilla, J. (1995). Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 145-152.

Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B., Jumel, K., e Harding, S. E. (2002). Pressure cell assisted solution characterization of polysaccharides. 2. Locust bean gum and tara gum. *Biomacromolecules*, 3(4), 761-767.

Roseiro, J., Gírio, F., e Amaral-Collaço, M. (1991). The influence of storage stability on the use of carob pulp aqueous extract as raw material for fermentation processes. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 24(6), 508-512.

Salucci, M., Stivala, L., Maiani, G., Bugianesi, R., e Vannini, V. (2002). Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *British journal of cancer*, 86(10), 1645-1651.

Santos, M., Rodrigues, A., e Teixeira, J. A. (2005). Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostocmesenteroides* NRRL B512 (f). *Biochemical engineering journal*, 25(1), 1-6.

Scalbert, A. (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues *Basic Life Sciences: Plant polyphenols*, 59, 259-280.

Scalbert, A., e Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.

Sebai, H., Souli, A., Chehimi, L., Rtibi, K., Amri, M., El-Benna, J., e Sakly, M. (2012). In vitro and in vivo antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(2), 85-90.

Şenel, S. (2010). Potential applications of chitosan in oral mucosal delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol*, 20, 23-32.

Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., e Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *The Journal of nutrition*, 131(4), 1207-1210.

Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., e Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease:

bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4855-4873.

Smith, B. M. (2009). *Characterization and functionality of carob germ proteins*. Kansas State University, Estados Unidos da América.

Tsai, A. C., e Peng, B. (1981). Effects of locust bean gum on glucose tolerance, sugar digestion, and gastric motility in rats. *The Journal of nutrition*, 111(12), 2152-2156.

Urdiain, M., Doménech-Sánchez, A., Albertí, S., Benedi, V., e Rosselló*, J. (2004). Identification of two additives, locust bean gum (E-410) and guar gum (E-412), in food products by DNA-based methods. *Food additives and contaminants*, 21(7), 619-625.

Zunft, H., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H., Koebnick, C., e Grünwald, J. (2003). Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *European journal of nutrition*, 42(5), 235-242.